

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA
REGULACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
TEJIDO CONECTIVO. PAPEL EN LA GÉNESIS Y
PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL.

Tesis Doctoral

Elsa Sánchez López

Madrid, 2008

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA
REGULACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
TEJIDO CONECTIVO. PAPEL EN LA GÉNESIS Y
PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL.**

Tesis Doctoral

**Elsa Sánchez López
Licenciada en Biología**

**Directores: Marta Ruiz-Ortega y Jesús Egido de los Ríos
Servicio de Nefrología e Hipertensión
Fundación Jiménez-Díaz**

Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,
y Doña Marta Ruiz-Ortega, Profesor contratado Doctor de la Universidad Autónoma,

CERTIFICAN

Que Doña Elsa Sánchez López, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Mecanismos moleculares implicados en la regulación del factor de crecimiento de tejido conectivo. Papel en la génesis y progresión del daño renal” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 27 de Mayo de 2008

Dr. Jesús Egido de los Ríos

Dra. Marta Ruiz-Ortega

*“Nuestra recompensa se encuentra en el
esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total
es una victoria completa”.*

Mahatma Gandhi

***A mis padres,
A Silvia y Ricardo.***

Agradecimientos

Bueno, llego el momento de dar las gracias, lo que significa que esta tesis está por fin acabada, ¡yuhu!

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Egido que me diera la oportunidad de aprender y trabajar en su laboratorio. En especial a Marta, gracias por tu confianza y apoyo, por ser mi directora de tesis y todo lo que me ha enseñado durante estos años no solo en lo profesional sino también en lo personal.

A vosotros tengo mucho que agradeceros, y lo cierto es que no sé por donde empezar. Mamá, Papá, gracias por darme siempre vuestro apoyo, confianza, y cariño, y por dejarme tomar mis propias decisiones con libertad y enseñarme a trabajar duro para conseguir mis objetivos. Que más puedo decir, ¡me alegro de parecerme a vosotros! Silvi, eres la mejor hermana que se puede tener!! Muchas gracias por tus ánimos y por estar siempre ahí dispuesta a escucharme. ¡¡Tati, eres la mejor y de mayor quiero ser como tu!! Bueno, abuelitos aquí esta la tesis, cuanto siento que no podáis estar conmigo ahora, sé que os llenaría de orgullo, igual que yo lo estoy de vosotros. Gracias abuela Concha, ojalá hubieras estado más tiempo conmigo; abuelito Valentín, gracias por trasmitirme tu inquietud por saber; y a mi abuelo Aurelio, mi calvito, que siempre me hizo saber lo orgulloso que se sentía. Y como no a mi abuela Paula, gracias por todo lo que nos has dado siempre, ¡abuelita eres un sol! Habrá que hacer unas migas para celebrarlo, eh! Familia somos muchos para nombraros a todos pero quiero daros las gracias por el cariño y el apoyo que me habéis dado siempre. Gracias a Feli y a Luis, por su cariño y por hacerme sentir una más de su familia. A Virgi y a Mario, por esos domingos por la tarde que conseguían que me levantase del ordenador y me olvidase de la tesis. Y a la abuela Andrea, gracias por su cariño y por esas rosquillas que están divinas.

A los que me han aguantado sin entender que hacía trabajando tantas horas sin “horas extra”, que fuese a trabajar en días de fiesta teniendo una beca, y a quienes siempre han mostrado interés aunque le sonase a chino lo que les contaba. A Tichi y Miriam, porque siempre estáis ahí; a Bea, Ali y Bego, gracias por los años de Uni, y por esas cañitas y risas en Sol que ya son un clásico; a Gala, Ana y Bego (si otra vez tú), por esos partiditos de Padel (por llamarlo de alguna manera), que nos hacen empezar la semana a carcajadas; a mis Alhondigueños, con esta tesis se acaban mis excusas para escaquearme del frío Alcarreño, tendré que inventarme algo...gracias por los ánimos y las risas, sois geniales.

Durante estos años en el laboratorio, he compartido además de muchas horas de trabajo, buenos y malos momentos con vosotros, y creo justo agradeceros el compañerismo y la amistad que me habéis dado. Eva, muchas gracias por estar siempre a mi lado. Me has enseñado con tu fortaleza que siempre hay que mirar hacia delante, sé que conseguirás todo lo que te propongas, y espero estar ahí para celebrarlo contigo, snif, snif, al final lloro...habrá que buscar un curro para las dos porque sino... Crispi, ¡como te echo de menos! aunque tu sitio está en buenas manos, en el laboratorio me falta

tu alegría. Ha sido una suerte haber contado contigo como compañera y amiga. Beita, que ya no te queda nada para la tuya... estas como una cabra, y eres una de las mejores personas que hay en el labo, ¡ahí queda eso!. Bueno chicas y ahora que hacemos todas con una tesis bajo el brazo... Conchi, la discreción en persona, danos un poco de carnaza...que pasó con Yurguen! Gracias por estar siempre dispuesta a escuchar, y como sé que tu no lo intentarás más, ya lo digo yo ¡a ver cuando salimos...! Virchu, ya sabes que a veces me pones de los nervios, pero tengo que confesar algo ¡que te quiero un montón! Sara, gracias por tus risas, tus canciones, tu alegría y esas ocurrencias que algunas veces Irene tiene que explicarnos. Irene, desde que dejaste salir tu lado "malo", ¡para mí eres la jefa! Chicas contad conmigo para lo que necesitéis, aunque lo tengáis prohibido. Van, a ti quiero darte unas gracias muy grandes, no sólo por enseñarme a trabajar sino por ser una gran compañera y amiga, siempre con una sonrisa y ese puntito quinqui, eres de lo mejor que ha pasado por este labo y lo serás vayas donde vayas. Jon, gracias por tu ayuda y tu apoyo todo este tiempo, he aprendido mucho de ti y sé que te irá muy bien en el futuro, porque esta claro que has nacido para esto, buena suerte in London!!! Avo, a ti no sé si darte las gracias... siempre estás ahí cuando sale mi vena Mr. Bean (¡mira que eres oportuno!), aunque creo que sin ti no encontraría nada en el laboratorio, así que gracias por estar siempre ahí, sé que te irá bien porque hay mucho dentro de esa cabecita. Alberto, el otro alérgico a la vida, pero ahí estamos aguantando como unos campeones... Gracias por todo, por tu apoyo en los momentos difíciles, y por estar ahí día a día, espero que sepas que tienes una amiga. Carlos Pastor, como eminencia de "la funda" tengo que agradecerle la ayuda prestada, sin ti los western blot de colágeno no estarían ahí. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudar y por enseñarme que se puede ir a otro ritmo en la vida. Alfi, sabes que el labo no es lo mismo sin ti, aunque ahora es Sara la que no deja pasar ni un silencio en las comidas. Espero que todo te vaya muy bien, porque te mereces eso y mucho más. Julito, gracias por tu apoyo y tus animos, y ¡cuídate hombre! Chicos, nunca olvidaré ese primer congreso en Milán.

A mis compañeros de grupo, Raquel, Sandra, Raúl y Javi, gracias por vuestra ayuda en estos últimos tiempos, espero que tengáis mucha suerte y que sepáis que podéis contar conmigo para lo que necesitéis. A todos los demás, muchas gracias por que siempre hay algo que agradecer: a Alberto Ortiz, por su ayuda prestada; a Sergio Mezzano desde Chile; a Luiz Stark, por su ayuda desde La Paz; a los veteranos Carmen, Luis y José Luis; Ana; Gisselle (espero verte pronto por aquí, gracias por tu ayuda); Loli, Rosario, Susana, Bego, Julio, Juan, Roxana, Adrián, David, Sebas, Oscar López, Lupe, Oscar Lorenzo, Paula, Beñat, Jesús González,...A los que se fueron buscando otras oportunidades, Mari Angeles, Almudena, Pilar, Puri, Willy, Mónica, Marivi, Susana, Raúl, Esther, Sandra, Maru, Félix, Vero, Cécile y Albertito.

Creo necesario agradecer la ayuda de la gente de los laboratorio cercanos, quienes siempre nos reciben con una sonrisa cuando vamos a mendigar con carita de pena...A los "esbrit", Juanan y Vero (mucha suerte), Luis y Dani (o lo que es lo mismo zipi y zape), y a Irene (paciencia con estos dos...); a las dos Arantxa y a David. A los "caramelo", Nando, Ruth, Olaya, Sergio y Juanjo (al final me ganaste, enhorabuena!!). De "inmuno", a Bea (mira que hemos echado horas!!!), Bárbara, Marina, Gloria, Aroa y Fernando. De "reuma", a Miriam (mucha suerte y fuerzas para la recta final), Lidia (suerte y mucho

ánimo) y Juan. A Curra, gracias por tu ayuda, tus consejos, y esas risas que hacían que las horas de confocal se pasasen voladas. A toda la gente que nos hace el trabajo más fácil: Pilar, Juani, Luisa y Carlos (en el animalario), Carmen, Regula, Encarna, Isabel y Flor.

Por último, quiero dar las gracias a Ricardo, sin ti no lo habría conseguido, gracias por estar siempre a mi lado, haciendo que mirase hacia delante, recordándome lo valioso de trabajar en aquello que me gusta, y enseñándome cada día que es lo verdaderamente importante en la vida. GRACIAS.

Espero no haber olvidado a nadie, si es así de verdad lo siento. Gracias a todos por soportarme, ayudarme, animarme, apoyarme, enseñarme y quererme aunque sea un poquito. GRACIAS.

Elsa.

RESUMEN

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) participa en diversos procesos biológicos. En esta tesis hemos investigado el papel de CTGF en la progresión del daño renal, su regulación y su implicación en la inflamación.

Primeramente, hemos evaluado la presencia de CTGF durante la progresión del daño renal. En un modelo de daño renal inducido por infusión sistémica de Angiotensina II (AngII) en ratas, hemos demostrado que en la primera etapa del daño, se induce un proceso inflamatorio, que coincide con la inducción de CTGF, sugiriendo que este factor participa en el proceso inflamatorio. CTGF precede en el tiempo a la activación de TGF- β y a la acumulación de fibronectina, y continúa aumentando en etapas más avanzadas del daño, sugiriendo que CTGF participa en la progresión de la fibrosis y la transición epitelio-mesénquima.

En células mesangiales en cultivo, hemos demostrado que CTGF es un mediador de la respuesta fibrótica causada por AngII regulando la producción de fibronectina y colágeno IV. En estas células, hemos observado que la presencia simultánea de factores profibróticos y citoquinas (AngII, TGF- β e IL-6), aumenta la producción de CTGF. Sin embargo, IL-1 β actúa como un regulador negativo de la producción de CTGF. Además IL-1 β , vía ERK1/2 disminuye la producción de colágeno IV causada por AngII, al inhibir la expresión de CTGF y aumentar la actividad de MMP-9, enzima que degrada colágeno IV. IL-1 β también inhibe la producción de colágeno IV causada por CTGF, demostrando que IL-1 β bloquea su síntesis y sus acciones. Estos resultados demuestran que durante el daño renal coexisten diversos factores inflamatorios y fibróticos que promueven la producción de CTGF (AngII, TGF- β e IL-6), y otros como IL-1 β que actúan como represores de su síntesis y sus repuestas.

Por último, hemos investigado el efecto directo de CTGF en el daño renal y su papel en la respuesta inflamatoria. Mediante un modelo de administración sistémica de CTGF en ratones, hemos demostrado que CTGF induce la presencia de infiltrado inflamatorio intersticial, la activación del factor NF κ B, y la producción de quimioquinas y citoquinas. El tratamiento con el inhibidor de NF κ B, Parthenolide, disminuyó el infiltrado inflamatorio y la producción de mediadores de inflamación indicando que la respuesta inflamatoria causada por CTGF en el riñón es dependiente de NF κ B. En experimentos *in vitro* en células tubuloepiteliales murinas, hemos demostrado que CTGF activa NF κ B (capacidad de unión al ADN y traslocación nuclear de las subunidades p50, p65 y p52), y degrada la subunidad I κ B α citosólica, a través de la activación de la cascada de quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Además, el bloqueo de NF κ B inhibe la producción de mediadores proinflamatorios (MCP-1, IL-6 e ICAM-1) causado por CTGF.

En conclusión, CTGF participa en la génesis del daño renal mediante la producción de factores inflamatorios a través de la activación de la vía de señalización del factor NF κ B, y en la progresión induciendo la síntesis de proteínas de matriz extracelular.

SUMMARY

Connective tissue growth factor (CTGF) participates in many biological processes. In this thesis, we have investigated the role of CTGF in renal damage progression, its regulation and its potential implication in inflammation.

Firstly, we have evaluated CTGF levels during progressive renal damage. In a model of renal injury induced by systemic infusion of Angiotensin II (AngII) into rats, we have demonstrated that at early stage of damage, an inflammatory process is induced coincidentally with CTGF induction, suggesting that CTGF participates in the regulation of the inflammatory responses. CTGF upregulation occurs earlier than TGF- β activation and fibronectin deposition. Renal CTGF levels remains elevated in advanced stage, suggesting that CTGF participates in the progression of fibrosis and mesenchymal-epithelial transition.

In cultured mesangial cells, we have demonstrated that CTGF is a mediator of AngII-induced fibrosis, regulating fibronectin and collagen IV production. In these cells, we have observed that the simultaneous presence of pro-fibrotic factors and cytokines (AngII, TGF- β and IL-6) increase CTGF production. However, IL-1 β acts as a negative regulator of CTGF. Moreover IL-1 β , through MAPK pathway, diminishes collagen IV production mediated by AngII, by inhibiting CTGF expression and increasing MMP-9 activity, enzyme that degrades collagen IV. IL-1 β also inhibits collagen IV production caused by CTGF, demonstrating that IL-1 β can inhibit CTGF synthesis and responses. All these data show that during renal damage several pro-inflammatory and pro-fibrotic factors promote CTGF production, such as AngII and TGF- β and others like IL-1 β acts as repressor of CTGF synthesis and responses.

Finally, we have investigated the *in vivo* effect of CTGF on renal damage and its role in the inflammatory response. Using a model of systemic administration of CTGF into mice, we have demonstrated that CTGF induces interstitial inflammatory cell infiltration, activation of the NF κ B pathway and overproduction of chemokines and cytokines. Treatment with the NF κ B inhibitor Parthenolide diminishes inflammatory cell infiltration, and the production of inflammatory mediators, indicating that inflammatory response caused by CTGF in the kidney is mediated by NF κ B pathway. In studies in tubuloe epithelial murine cells, we have demonstrated that CTGF activates NF κ B (DNA binding activity and nuclear translocation of p50, p65 and p52 subunits), and reduces cytosolic I κ B α levels, through the activation of the cascade of mitogen activated protein kinase (MAPKs). NF κ B blockade inhibits the production of proinflammatory mediators (MCP-1, IL-6 and ICAM-1) caused by CTGF in these cells.

In summary, CTGF participates in renal damage pathology by the production of inflammatory mediators through NF κ B signaling pathway, and promotes the progression of renal damage contributing to extracellular matrix production.

Clave de Abreviaturas	1
 I. INTRODUCCION	
1. El Riñón.	6
1.1. Progresión del Daño Renal.	7
2. El Sistema Renina-Angiotensina.	9
2.1. Angiotensina II.	10
2.2. Respuesta Inflamatoria mediada por Angiotensina II.	11
2.2.1. Cambios en la permeabilidad vascular por Angiotensina II: Papel del factor de crecimiento endotelial vascular.	11
2.2.2. Angiotensina II como citoquina Inflamatoria.	12
2.3. Respuesta Fibrótica mediada por Angiotensina II.	13
3. Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF).	14
3.1. Familia de Genes CCN.	14
3.2. Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF).	15
3.3. Papel de CTGF en el daño renal.	17
4. Familia de citoquinas Interleuquina-1.	17
4.1. Receptores de la familia Interleuquina-1.	18
4.2. Mecanismos intracelulares de transducción de la señal de Interleuquina-1.	19
4.3. Interleuquina-1 en el Daño Renal.	20
5. Mecanismos de Señalización Intracelulares.	20
5.1. Vía de señalización del Factor Nuclear κ B (NF κ B).	20
5.2. Ruta de Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).	22
5.2.1. Vía de señalización de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK).	22
5.2.2. Vía de señalización de la quinasa NH ₂ -terminal jun (JNK).	23
5.2.3. Vía de señalización de la quinasa p38.	24

II. OBJETIVOS

Objetivos.	26
-------------------	-----------

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos Experimentales.	28
1.1. Modelo experimental de Infusión sistémica de Angiotensina II en rata.	28
1.2. Modelo experimental de administración sistémica de CTGF en ratón.	28
2. Cultivos Celulares.	30
2.1. Cultivo primario de células mesangiales de rata (CM).	30
2.2. Línea de células tubuloepiteliales proximales humanas (HK-2).	30
2.3. Línea de células tubuloepiteliales proximales murinas (MCT).	31
3. Extracción y Medida de la calidad-pureza del ARN.	32
3.1. Northern Blot.	32
3.2. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real.	33
4. Determinación de la Activación del factor de transcripción NFκB: Ensayo de EMSA.	34
4.1. Extracción de proteínas nucleares de tejido.	34
4.2. Extracción de proteínas nucleares de células en cultivo.	34
4.3. Ensayo de actividad de unión al ADN.	35
5. Determinación de la Actividad Gelatinolítica de Metaloproteasas: Zimografía.	35
6. Determinación de niveles proteicos.	36
6.1. Análisis de Western Blot.	36
6.2. Ensayo de ELISA.	37
6.3. Ensayo de Inmunofluorescencia.	37
7. Transfecciones transitorias y Ensayo de Actividad Luciferasa.	37
8. Estudios con los oligonucleotidos antisentido de CTGF.	38
9. Morfología e Inmunohistoquímica.	38
9.1. Ensayo de Inmunohistoquímica.	38
10. Análisis Estadístico.	40

IV. RESULTADOS

PARTE I: ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE CTGF <i>IN VIVO</i>: CORRELACIÓN CON LA	
PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL.	42
1. Estudios <i>in vivo</i> en el modelo experimental de daño renal por infusión sistémica de Angiotensina II.	42
PARTE II: CTGF ES MEDIADOR DE LA FIBROSIS RENAL.	47
1. CTGF participa en la producción de fibronectina y colágeno IV causada por AngII en CM.	47
PARTE III: MECANISMOS DE REGULACIÓN DE CTGF Y DE SU RESPUESTA FIBRÓTICA: ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>.	49
1. Mecanismos intracelulares que participan en la producción de CTGF por AngII en células renales.	49
2. Efecto de la presencia simultánea de factores inflamatorios y fibróticos en la expresión de CTGF en CM.	50
3. IL-1 β inhibe la expresión génica y la producción de CTGF inducida por AngII en CM.	52
4. IL-1 β disminuye la expresión génica y la producción de colágeno IV inducidas por AngII y CTGF en CM.	53
5. Mecanismos intracelulares que participan en la expresión de Colágeno IV por AngII en CM.	55
6. IL-1 β no modifica la expresión de TGF- β y Trombospondina-1 causada por AngII en CM.	56
7. IL-1 β inhibe la síntesis de CTGF y colágeno tipo IV a través de la quinasa ERK1/2.	56
8. La coincubación de IL-1 β y AngII aumenta de forma sinérgica la activación de ERK1/2, pero no p38-MAPK, JNK, ROCK o PI3K/AKT.	58
9. Efecto sinérgico de la coincubación de IL-1 β y AngII sobre la expresión y	

actividad de MMP-9. Papel de la quinasa ERK1/2.	60
PARTE IV: EFECTO DE CTGF EN EL RIÑÓN.	63
1. Efecto de la administración sistémica de CTGF: Estudios experimentales en ratón.	63
2. CTGF causa el infiltrado de células inflamatorias en áreas tubulointersticiales.	64
3. Papel de NFκB en la respuesta inflamatoria renal causada por CTGF.	65
4. CTGF incrementa la expresión génica y la síntesis de factores quimiotácticos y citoquinas vía NFκB en el riñón.	66
PARTE V: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO INFLAMATORIO INDUCIDO POR CTGF. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>.	69
1. CTGF activa la vía de señalización de NFκB en células tubuloepiteliales murinas en cultivo (MCT).	69
2. CTGF activa la cascada de señalización de MAPK en células tubuloepiteliales en cultivo.	71
3. Mecanismos implicados en la vía de señalización NFκB. Papel de MAPK.	72
4. CTGF incrementa mediadores inflamatorios a través de NFκB en células tubuloepiteliales.	73
V. DISCUSIÓN	
CTGF ES UN FACTOR CLAVE EN LA PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL.	76
1. CTGF se induce en la etapa inflamatoria del daño renal causado por AngII.	76
2. CTGF es un mediador de la fibrosis renal inducida por AngII.	76
3. Relación entre CTGF y TGF-β en la regulación de la fibrosis y la transición epitelio-mesénquima (TEM).	77
MECANISMOS DE REGULACIÓN DE CTGF EN CÉLULAS RENALES.	78
1. Vías de señalización implicadas en la regulación de CTGF.	78
2. IL-1β actúa como un regulador negativo de la síntesis y las respuestas celulares de CTGF en CM.	80

PAPEL DE CTGF EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL.	84
1. CTGF induce el reclutamiento de células inflamatorias infiltrantes en el riñón.	84
2. CTGF activa la señalización de NFκB en el riñón.	84
3. CTGF induce la producción de quimioquinas y citoquinas <i>in vivo</i> a través de la ruta de NFκB.	84
4. CTGF induce la expresión de mediadores inflamatorios a través de NFκB en células tubuloepiteliales.	87
 VI. CONCLUSIONES	
 Conclusiones.	 92
 VII. BIBLIOGRAFÍA	
 Bibliografía.	 95
 VIII. ANEXO	 120

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGES	Productos terminales de glicosilación avanzada
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMP-A	Aminopeptidasa A
AMP-N	Aminopetidasa N
AngI	Angiotensina I
AngII	Angiotensina II
AngIII	Angiotensina III
AngIV	Angiotensina IV
Ang(1-7)	Angiotensina (1-7)
ANOVA	Análisis de la varianza entre grupos
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
AT ₁	Receptor tipo 1 de AngII
AT ₂	Receptor tipo 2 de AngII
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína morfogenética del Hueso
BSA	Albúmina de suero bovino
CCR2	Receptor de MCP-1
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CM	Células mesangiales de rata obtenidas de cultivo primario
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta adenosina monofosfato cíclico
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DS	Desviación estándar
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECA2	Enzima convertidora de angiotensina 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Corresponde a las siglas: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMSA	Ensayo de retardo de movilidad electroforética
ErbB4	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 4
ERK1/2	Quinasa de regulada por señales extracelulares 1/2
ET-1	Endotelina -1
FAK	Quinasa de Adhesión focal

FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato dehidrogenasa
GM-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HK-2	Células tubuloepiteliales proximales humanas inmortalizadas
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN- γ	Interferón- γ
IgA	Inmunoglobulina A
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP	Proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina.
I κ B	Subunidad inhibitoria κ B
IKK	Quinasa de I κ B
IL-1 α	Interleuquina-1 α
IL-1 β	Interleuquina-1 β
IL-4	Interleuquina-4
IL-6	Interleuquina-6
IL-10	Interleuquina-10
IL-1Ra	Antagonista del receptor de IL-1
IL-1RI	Receptor tipo I de IL-1
IL-1RII	Receptor tipo II de IL-1
IL-1RAcP	Proteína accesoria del receptor de IL-1
ILK	Quinasa ligada a Integrinas
IP	Ioduro de Propidio
IP-10	Proteína inducible por Interferón -10
IRAP	Aminopeptidasa regulada por insulina
JAK	Quinasa Janus
JNK1/2	Quinasa NH ₂ terminal de c-jun 1/2
KCl	Cloruro potásico
LPA	Ácido Lisofosfatídico
LPR	Receptor de Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacarido bacteriano
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos-1
MCT	Células tubuloepiteliales proximales murinas
MEC	Proteínas de Matriz extracelular
MEK	Quinasa de la MAPK activada por señales extracelulares
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α
MIP-2 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 2 α
MMP-9	Metaloproteasa de matriz-9
NEP	Endopeptidasa neutral ó Neprilisina

NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF κ B	Factor nuclear de transcripción κ B
NIK	Quinasa inductora de NF κ B
NO	Óxido nítrico
ODN	Oligonucleotido
OPN	Osteopontina
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida. Corresponde a las siglas del inglés: Poliacrilamide gel electrophoresis.
PAI-1	Inhibidor del Activador del plasminógeno 1
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDAR	Ensayos taqman prediseñados
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDTC	Pirrolidin-ditiocarbamato
PEP	Proliendopeptidasa
PI3K/Akt	Fosfatidil inositol 3 quinasa / Akt
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PTHrP	Proteína relacionada con la hormona paratiroidea
PTK	Proteínas tirosina quinasas
RANTES	Proteína regulada sobre activación: expresada y secretada por células T. Corresponde a las siglas del inglés: regulated on activation, normal T expressed and secreted.
REDOX	Reacciones de óxido-reducción
ROCK	Quinasa de Rho
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Corresponde a las siglas: Rapid Prototyping and Manufacturing Institute
RTK	Receptores Tirosina Quinasa
α -SMA	Actina de músculo liso - α
SRA	Sistema renina angiotensina
STAT	Proteínas activadoras de la transcripción y transductoras de la señal. Corresponde a las siglas del inglés: Signal transducer and activators of transcription.
STF	Suero ternera fetal
TAB	Proteína de unión a la quinasa activada por TGF- β
TAK	Quinasa activada por TGF- β
TBE	Tampón Tris-HCl/ácido bórico/EDTA
TBS	Tampón Tris/salino
TE	Tampón Tris-HCl/ EDTA
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β

Th1	Células T colaboradoras 1
Th2	Células T colaboradoras 2
TIMP-1	Proteína inhibidora de metaloproteasa tisular 1
TIR	Dominios del receptor de IL-1 β parecidos a Toll
TLR	Receptores parecidos a Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF
UUO	Obstrucción unilateral de uréter
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR2	Receptor tipo 2 de VEGF

Introducción

1. EL RIÑÓN.

El riñón es el órgano encargado de la filtración de la sangre para limpiarla de sustancias tóxicas. Durante este filtrado se produce la eliminación a través de la orina de residuos metabólicos del organismo (como urea, creatinina, potasio y fósforo), por medio de un sistema complejo que incluye mecanismos de filtración, reabsorción y excreción. Además, el riñón es el principal productor de sustancias como la eritropoyetina que ayuda a regular la producción de los glóbulos rojos; la renina que interviene en el mantenimiento de la presión arterial; y la forma activa de la vitamina D que ayuda a mantener el calcio necesario para los huesos.

En su interior se observan dos zonas diferenciadas: la corteza, situada en la periferia; y la médula en el interior. La unidad estructural y funcional del riñón es la nefrona. El riñón humano está constituido por aproximadamente un millón de nefronas, que presentan una región globosa denominada Corpúsculo de Malpighi (zona cortical) seguida de un largo conducto doblado en forma de U denominado túbulo renal (constituyen las pirámides de Malpighi de la zona medular) (Figura 1).

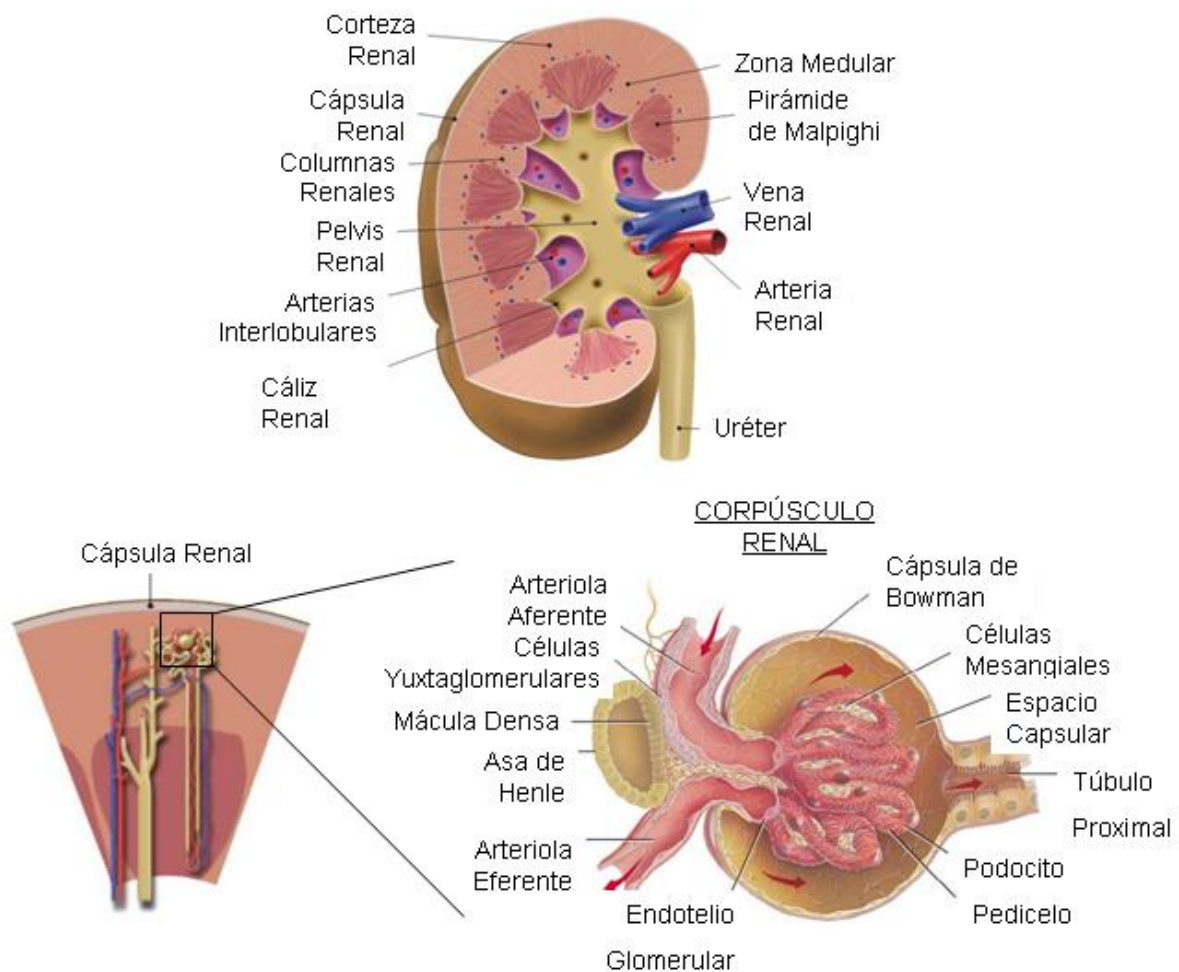


Figura 1: Estructura del riñón. Arriba, un corte esquemático del riñón que representa la morfología del órgano. En la parte inferior se muestra en detalle la estructura de la nefrona y del glomérulo.

El glomérulo (o corpúsculo renal) está formado por una red capilar rodeada de células endoteliales, una región central formada por células mesangiales y podocitos que componen la membrana basal, y la capa parietal que forma la cápsula de Bowman. Las células mesangiales poseen una forma irregular, con un núcleo denso y prolongaciones citoplasmáticas alargadas, y contienen grandes cantidades de microfilamentos de actina y miosina que les confieren propiedades funcionales de células de músculo liso. Además de su función estructural, las células mesangiales participan en la filtración glomerular y en el aclaramiento de macromoléculas; tienen capacidad fagocítica y están implicadas en la generación y degradación de proteínas de matriz extracelular (MEC), pudiendo participar en la progresión del daño glomerular^{146,169,229}. Por su parte, las células tubuloepteliales están localizadas en la corteza renal formando el espacio tubulointersticial. Regulan la entrada y salida de solutos del túbulo en el proceso de formación de la orina. En el túbulo proximal se produce la absorción de sustancias metabólicas útiles como glucosa, sodio, aminoácidos y péptidos, mediante endocitosis mediada por receptores.

1.1. PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL

Las células renales residentes desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio y fibrótico que tiene lugar en muchas enfermedades renales. Las células mesangiales y las células tubuloepteliales participan en las etapas tempranas del daño renal ya que son capaces de producir mediadores inflamatorios, moléculas de adhesión y factores de crecimiento; y además pueden contribuir a la progresión del daño crónico, promoviendo la síntesis y acumulación de MEC que dan lugar al estado fibrótico^{56,199,200,206,271}.

Las células mesangiales son capaces de liberar citoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6); quimioquinas como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), la proteína inducible por interferon-10 (IP-10) y RANTES (proteína regulada sobre activación: expresada y secretada por células T); factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); componentes de matriz extracelular como fibronectina, trombospondina y colágenos; y agentes vasoactivos como renina, angiotensina II (AngII), endotelina (ET-1) y prostaglandinas^{10,104,145,146,188,195,230,243,271}. Estudios *in vitro* con células tubuloepteliales humanas han demostrado que estas células son capaces de producir grandes cantidades de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, como IL-6 y TNF- α , MCP-1 y moléculas de adhesión (como molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1))^{24,119,184}. Se ha observado una correlación positiva entre la progresión del deterioro de la función renal, el aumento en la proteinuria y la expresión de quimioquinas como MCP-1, RANTES y TGF- β , en diferentes patologías renales, incluidos pacientes con nefropatía membranosa idiopática¹⁴⁹. La presencia de quimioquinas en el entorno de las células tubuloepteliales y glomerulares está asociado con la infiltración de células inflamatorias, como células T y macrófagos que perpetúan la activación de las células residentes como fibroblastos y células tubuloepteliales^{121,195,230}.

Diversas citoquinas proinflamatorias contribuyen a la progresión del daño renal, destacan IL-6, TNF- α , e IL-1 β . Todas estas citoquinas regulan el crecimiento de las células renales, la respuesta

inflamatoria y la matriz extracelular^{31,46,103,175,197,234,249}, y se han descrito niveles elevados en patologías renales humanas, como la glomerulonefritis proliferativa mesangial, nefritis por inmunocomplejos, nefritis por lupus y la nefrosis^{58,81,152,228}.

La fibrosis es una vía final común en la mayoría de las enfermedades renales que progresan a fallo renal incluidas glomerulonefritis inmune, nefritis tubulointersticial, desordenes hemodinámicos, enfermedades metabólicas y hereditarias. La fibrosis tubulointersticial se caracteriza por un exceso en la síntesis y acumulación de MEC, como colágenos y fibronectina, en parte atribuible a una elevada síntesis por los fibroblastos intersticiales, células tubuloepiteliales y mesangiales^{130,271}. La fibrosis tubulointersticial predice alteraciones funcionales del riñón de manera más sólida que el daño glomerular^{159,162}. Los mecanismos por los cuales la fibrosis intersticial progresa implican la producción elevada de citoquinas y factores de crecimiento que participan en el proceso inflamatorio y fibrogénico estimulando la proliferación de fibroblastos renales, favoreciendo la infiltración de macrófagos y contribuyendo a la acumulación de MEC^{130,263,271}.

Diversos factores de crecimiento contribuyen a la fibrosis renal, entre los que destaca, TGF- β , AngII, y CTGF, que como se comentará con más detalle más adelante, es un nuevo mediador pro-fibrótico clave en la fibrosis renal. TGF- β promueve la acumulación de MEC activando la síntesis e inhibiendo la degradación de estas proteínas^{9,15,16,150}. La elevada expresión renal de TGF- β ha sido demostrada en modelos experimentales de daño renal caracterizados por fibrosis; el aumento en la expresión de TGF- β 1 circulante en ratones transgénicos resultó en una marcada fibrosis tubulointersticial con glomerulonefritis severa²¹. En células mesangiales TGF- β estimula la producción de colágenos y fibronectina²¹⁶. En ratas sometidas a un modelo de nefrectomía 5/6, tanto CTGF como TGF- β fueron asociados con la fibrosis intersticial observada⁶⁷.

Muchas evidencias sugieren que bajo condiciones patológicas las células tubuloepiteliales pueden sufrir transición epitelio-mesénquima (TEM) convirtiéndose en fibroblastos productores de matriz extracelular, contribuyendo a la fibrosis renal y la progresión de la enfermedad renal¹⁹¹. La TEM se caracteriza por una conversión fenotípica de las células epiteliales a células fibroblásticas. Durante este proceso, se produce la inducción de marcadores mesenquimales, como α -actina de músculo liso (α -SMA, característico de miofibroblastos) y vimentina, y la desaparición de marcadores epiteliales como la E-cadherina que es esencial para mantener la integridad estructural del epitelio renal¹⁹¹. Citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y cambios en la composición de la matriz extracelular están implicadas en el desarrollo de la TEM¹⁹¹. La mayoría de los estudios de TEM se han centrado en el estudio de las respuestas de TGF- β . Este factor de crecimiento participa en todos los pasos de la TEM¹⁹¹.

Entre los tratamientos clínicos existentes para detener la progresión del daño renal, el bloqueo de AngII es una de las mejores opciones farmacológicas con probados efectos órgano-protectores²⁵⁵. Sin embargo, estas drogas solamente retardan el progreso de la enfermedad y es necesaria una nueva opción terapéutica para conseguir que regrese la fibrosis renal e impida el proceso de la TEM. Los

mecanismos moleculares implicados en la fibrosis renal y su modulación farmacológica son campos de investigación muy importantes en la enfermedad renal crónica.

2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.

El sistema renina angiotensina (SRA) constituye el principal regulador de la función renal, ya que presenta un papel clave en la homeostasis de la presión arterial y el balance de electrolitos. Muchos estudios han demostrado la activación del SRA en enfermedades renales experimentales y humanas^{200,255}. En situaciones patológicas se ha descrito un aumento en la concentración de enzimas proteolíticas y la activación del SRA local.

El SRA está formado por una serie de péptidos generados a partir de Angiotensinógeno por acción de diversas peptidasas. Las principales enzimas que catalizan estas reacciones son ectopeptidasas entre las que se encuentran: aminopeptidasas A (AMP-A) y N (AMP-N); enzima convertidora de angiotensina (ECA), poliendopeptidasa (PEP) y endopeptidasas neutral o neprilisina (NEP)⁶(Figura 2).

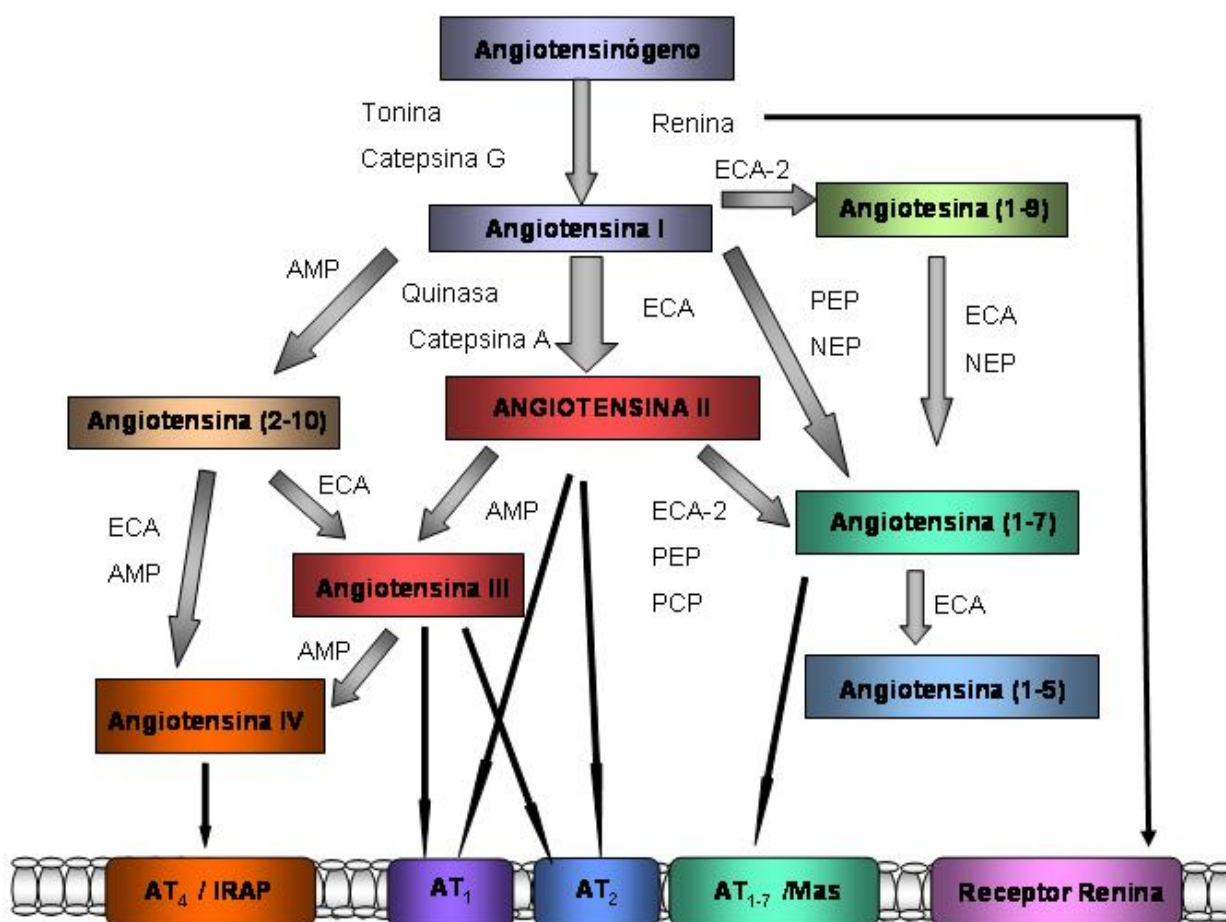


Figura 2 . Visión actual de los péptidos que componen el Sistema Renina Angiotensina. El esquema muestra los péptidos que componen este sistema así como las enzimas encargadas del procesamiento proteolítico en cada caso, así como los receptores que transducen sus respuestas.

El Angiotensinógeno por acción de la renina da lugar a la Angiotensina I (AngI). La ECA es una metaloproteasa dependiente de zinc que actúa sobre el extremo C-terminal de AngI dando lugar a AngII⁶. AngII, es el principal péptido efector de este sistema, y puede ser hidrolizada tanto por su extremo N-terminal, como por el C-terminal para dar lugar a los demás péptidos activos de este sistema. Por acción de las AMP la AngII da lugar a Angiotensina III (AngIII) y esta a su vez al hexapéptido Angiotensina IV (AngIV). En la unión entre los aminoácidos 7 y 8 de AngI o AngII puede actuar la serinproteasa PEP y dar como resultado la formación de Angiotensina (1-7) (Ang(1-7)).

2.1. Angiotensina II.

Entre los mecanismos propuestos por los cuales el daño renal progresa, se considera que AngII desempeña un papel central en el desarrollo de la inflamación y la fibrosis tubulointersticial así como de la glomérulo esclerosis^{56,200}. Las investigaciones realizadas en los últimos años han contribuido a modificar la visión clásica que hemos tenido de AngII como una hormona vasoactiva a considerarla como una verdadera citoquina, que ejerce un papel fundamental en la progresión del daño renal, actuando como un factor de crecimiento que contribuye al desarrollo de la respuesta inflamatoria y la progresión de la fibrosis^{200,202}. AngII activa respuestas intracelulares que participan en la señalización del proceso inflamatorio y fibrótico como la activación de la ruta de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK)⁷⁵, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NFκB), la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1)^{203,214}. Muchas de las acciones de AngII son mediadas por la producción endógena de factores de crecimiento como TGF-β y CTGF, y la regulación de mediadores inflamatorios incluyendo IL-6 y TNF-α y MCP-1^{200,201}. Recientemente se ha observado que AngII participa en la hiper celularidad y la apoptosis de células mesangiales, endoteliales y epiteliales durante el daño renal causado por la hipertensión⁵⁷.

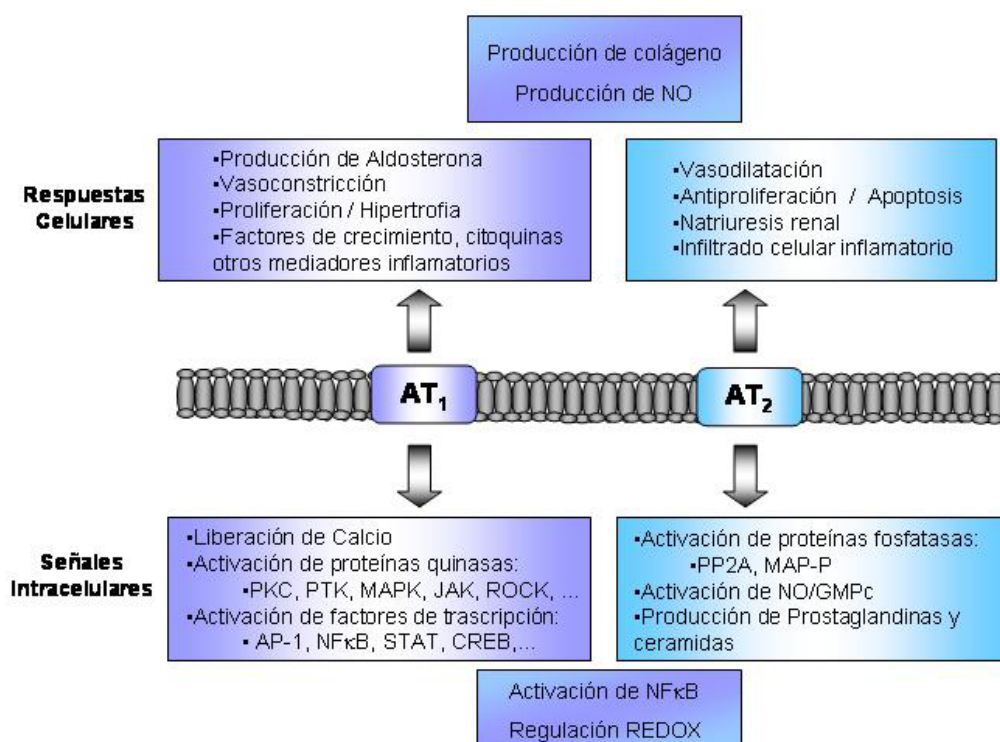


Figura 3: Respuestas celulares y mecanismos moleculares activados por AngII a través de sus receptores.

La AngII se une a sus receptores específicos AT_1 y AT_2 para activar las respuestas celulares (Figura 3). El receptor AT_1 media la regulación de factores de crecimiento y la acumulación de proteínas de matriz extracelular^{200,201}. Los mecanismos de señalización del receptor AT_1 son similares a los que utilizan las citoquinas induciendo la activación de varias proteínas quinasas como MAPK, quinasa de Rho (ROCK) y la vía de fosfatidil-inositol-3-quinasa/Akt (PI3K/Akt), y factores de transcripción como $NF\kappa B$ y AP-1^{75,200,202}. Los mecanismos de la progresión del daño renal siguen siendo desconocidos. Muchos factores de crecimiento y citoquinas son reguladas durante el daño renal, y es posible que estos factores puedan influenciar la respuesta de AngII en las células renales²⁰⁰.

2.2. Respuesta inflamatoria mediada por Angiotensina II.

La respuesta inflamatoria consiste en tres pasos: (a) Cambios vasculares (como el incremento de la permeabilidad vascular, cambios en el flujo y calibre de los vasos); (b) Infiltración de células inflamatorias; (c) Reconstitución del tejido y crecimiento celular (Figura 4).

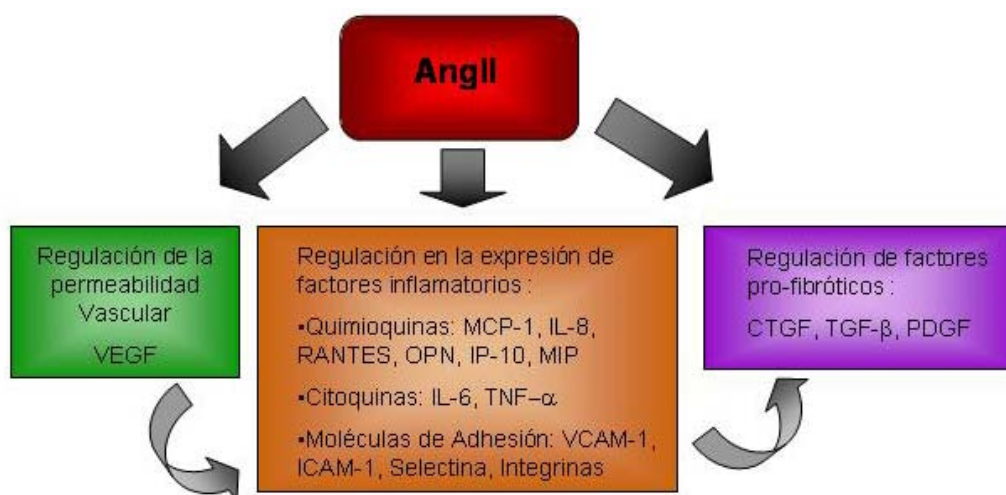


Figura 4: AngII participa en los pasos implicados en la respuesta inflamatoria.

2.2.1. Cambios en la permeabilidad vascular por Angiotensina II: Papel del factor de crecimiento Endotelial Vascular.

En los últimos años nuevos datos han apoyado la idea de que AngII podría localmente influenciar la permeabilidad del endotelio vascular a través de la producción de mediadores como las prostaglandinas y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)^{62,112,252}. Este factor, es uno de los mitógenos endoteliales y vasculares permeabilizantes más poderosos²⁷. Además VEGF regula diversas funciones como proliferación, migración, diferenciación, supervivencia y participa en el remodelado de la matriz^{34,63}. AngII *in vivo* e *in vitro* regula la expresión renal de VEGF por mecanismos que implican la activación del factor HIF-1 y estrés oxidativo, además de regular al expresión del receptor VEGFR2²¹⁴. Estudios adicionales son necesarios para definir el papel de VEGF en el daño renal.

2.2.2. Angiotensina II como citoquina inflamatoria.

La infiltración de células inflamatorias en el glomérulo o el intersticio tubular ocurre en la mayoría de las enfermedades renales progresivas y desempeña un importante papel en el desarrollo de cambios estructurales irreversibles. Varios estudios sugieren que AngII esta implicada en el inicio y progresión del proceso inflamatorio durante el daño renal. AngII es capaz de activar células inflamatorias circulantes que posteriormente se adhieren al endotelio y migran al interior de las distintas células residentes. Por mecanismos de quimiotaxis y mediante la producción de mediadores inflamatorios como moléculas de adhesión, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, estas células inflamatorias son activadas por AngII. Además, las células renales residentes producen AngII que es capaz de activar mecanismos de señalización intracelular que modifican el estado REDOX de la célula, y dan lugar a la producción de más mediadores inflamatorios (Figura 5).

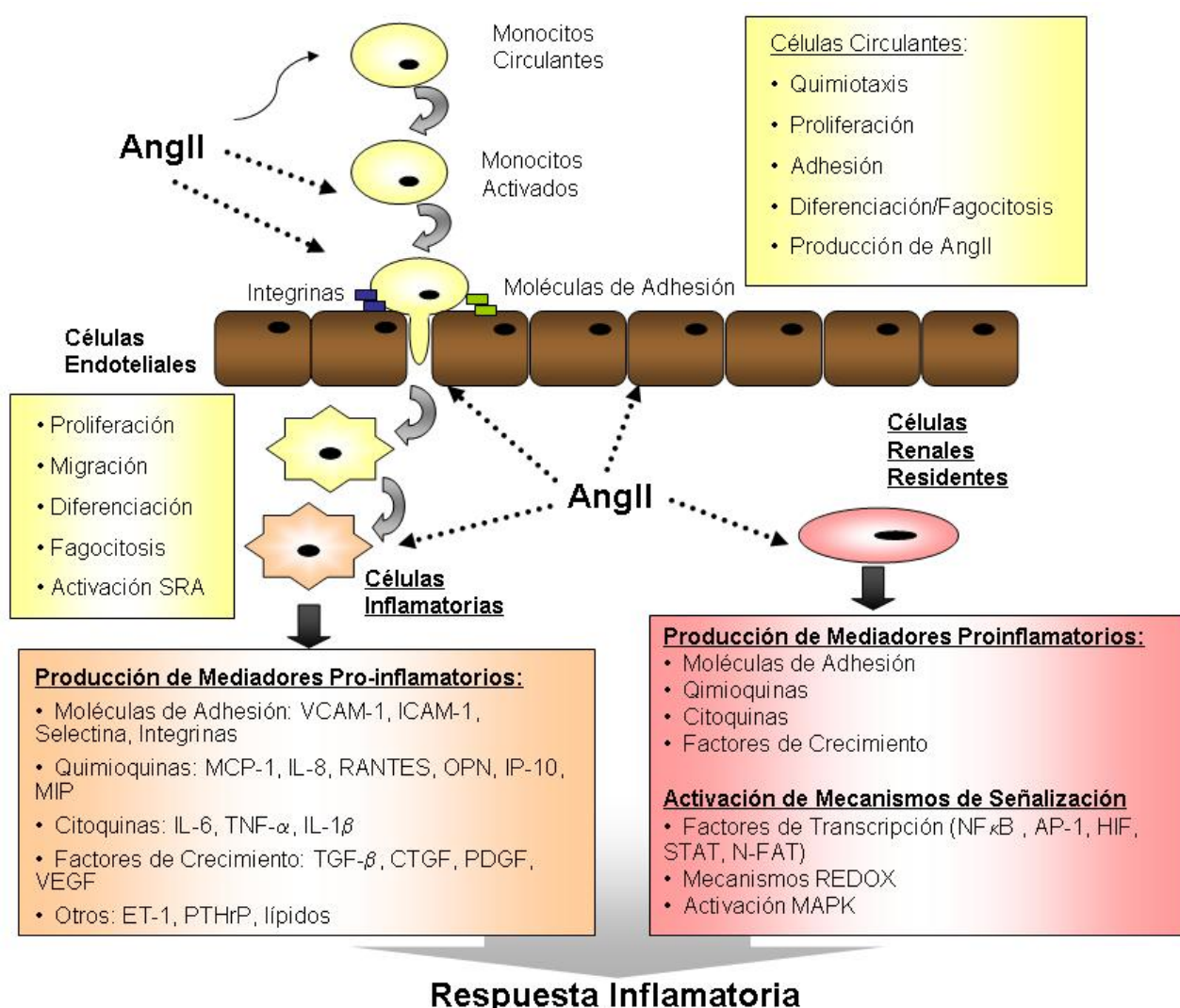


Figura 5: AngII participa en la respuesta inflamatoria activando a las células residentes y a las células inflamatorias.

In vivo, AngII incrementa la producción renal de TNF- α e IL-6, y activa al factor nuclear NF- κ B; efectos asociados con la presencia glomerular e intersticial de células inflamatorias^{88,200}. Los inhibidores de la ECA suprimen la producción de citoquinas *in vivo* e *in vitro*^{165,232}. IL-6 estimula la generación de

Angiotensinógeno potenciando la formación de AngII contribuyendo al mantenimiento del proceso inflamatorio²⁵. Además el bloqueo de IL-6 reduce la proliferación celular inducida por AngII¹⁵². La AngII también induce la producción de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) e ICAM-1, vía AT₁, MAPK y mecanismos REDOX^{37,232}, y además regula la expresión tubular de osteopontina (OPN, factor quimiotáctico de macrófagos), y potencia la expresión de RANTES en el glomérulo²⁵⁴. Además AngII es un potente inductor de la expresión de MCP-1 en células mesangiales y mononucleares²⁰³. El bloqueo farmacológico del SRA reduce la presencia de células inflamatorias en varios modelos de daño renal^{201,202,207}, y es capaz de reducir la expresión de estos factores quimiotácticos²⁰⁵. Estos datos consolidan la idea de AngII como un mediador inflamatorio que participa en el reclutamiento de células inflamatorias en los tejidos y activa señales intracelulares que llevan a la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio como son citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, óxido nítrico sintasa y angiotensinógeno²⁰².

2.3. Respuesta Fibrótica mediada por Angiotensina II.

AngII desempeña un papel importante en la fibrosis (Figura 6), activando las células tubuloepiteliales, fibroblastos intersticiales y células glomerulares, y regulando el crecimiento celular y la síntesis de MEC^{200,256}. Muchos estudios han demostrado que AngII participa en la fibrosis renal a través de la producción endógena de factores de crecimiento como CTGF y TGF- β ^{104,200,263}. En el riñón existe una interesante relación entre AngII y TGF- β . Los inhibidores de la ECA y los antagonistas del receptor AT₁ reducen la expresión de TGF- β y la fibrosis²⁵⁶. En células renales en cultivo, AngII estimula la expresión de TGF- β , y además el bloqueo de TGF- β modifica algunas respuestas de AngII, entre ellas la regulación de la MEC^{200,256}. TGF- β y AngII comparten muchas respuestas celulares^{200,256}. La mayoría de las acciones pro-fibróticas de TGF- β están mediadas por la activación de la ruta de señalización de las proteínas Smad⁶⁶. El bloqueo del receptor AT₁ disminuye la activación de la vía de señalización de las proteínas Smad en ratas con infarto de miocardio y en un modelo experimental de daño renal^{89,246}. Nuestro grupo ha sido el primero en demostrar que AngII activa la vía de señalización de las Smad independiente de TGF- β , en estudios realizados en células de músculo liso vascular (CMLV)¹⁹³. Recientemente también hemos demostrado en estudios *in vivo*, que en el riñón, y en células tubuloepiteliales en cultivo, la AngII activa directamente la ruta de las proteínas Smad³². Aunque TGF- β es uno de los principales factores que intervienen en la regulación de la fibrosis, las estrategias terapéuticas diseñadas para su bloqueo no han sido muy beneficiosas probablemente por sus propiedades anti-inflamatorias⁷⁶. Muchos estudios ya han demostrado que los inhibidores de AngII atenúan el aumento en la producción renal de TGF- β y la activación de su señal^{198,264}, mostrando que estos fármacos son una buena opción para bloquear TGF- β en humanos.

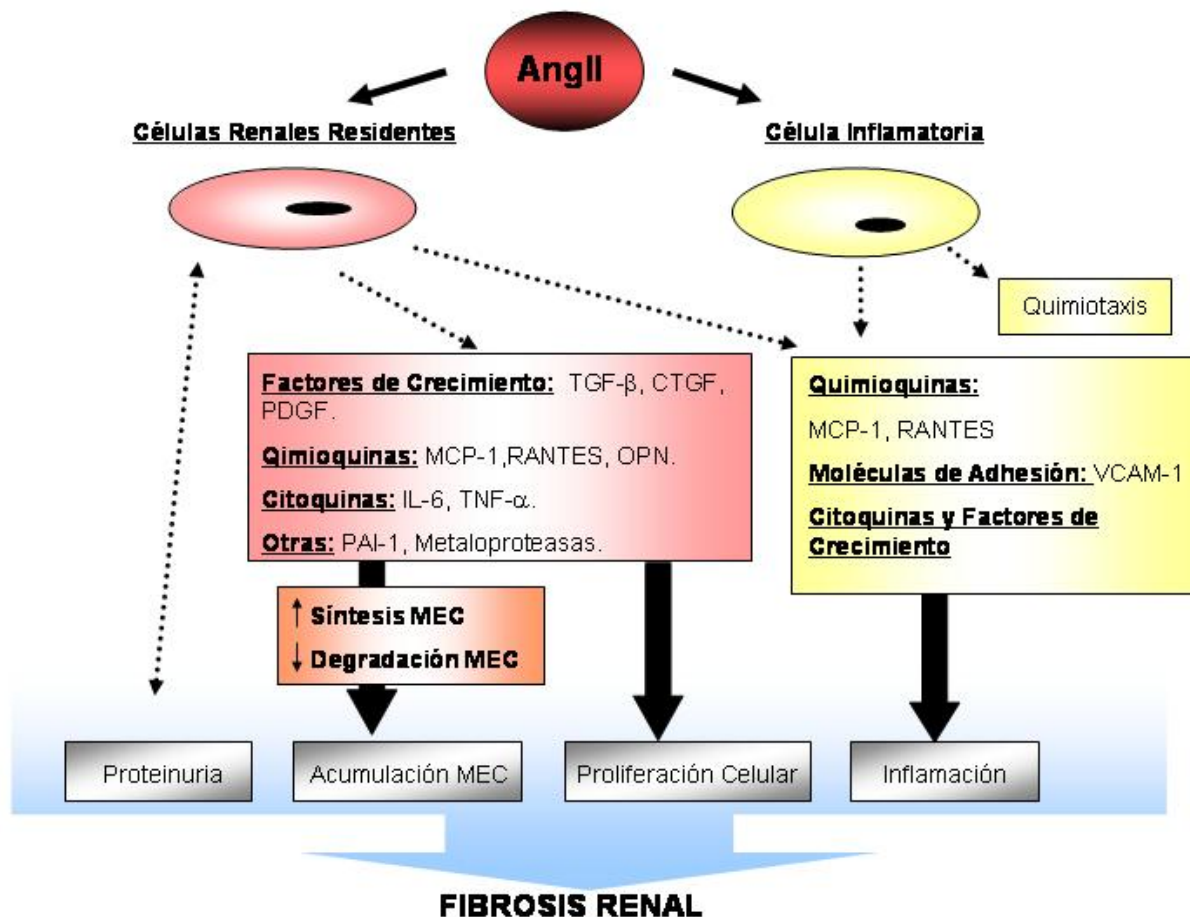


Figura 6: AngII participa en la respuesta fibrótica.

3. FACTOR DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CONECTIVO.

3.1 Familia de genes CCN.

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) también conocido como CCN2, es un miembro de la familia de genes de respuesta temprana CCN, que se compone de otros cinco miembros: Cyr61 (proteína rica en cisteína 61), Nov (gen sobreexpresado en nefroblastoma), WISP-1 (proteína secretada inducida por Wnt-1), WISP-2, y WISP-3^{26,82,123,177}. Los miembros de esta familia se caracterizan por un alto porcentaje de homología en su secuencia de aminoácidos que oscila entre un 50-90%. Estas proteínas poseen un péptido señal secretora en la región NH₂-terminal y cuatro dominios o módulos conservados¹⁷(Figura 7):

- Dominio de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), con la secuencia de unión conservada Gly-Cys-Gly-Cys-Cys-X-X-Cys que se localiza dentro de la región aminoterminal de todas las proteínas de unión a IGF^{5,11,27}.
- Dominio del factor Von Willebrand tipo C, participa en la oligomerización y formación de las proteínas¹³⁷.
- Dominio trombospondina-1, implicado en la unión de macromoléculas solubles y de matriz⁹⁵.

- Dominio C-terminal: dominio de dimerización, está implicado en la unión a la superficie celular, posee actividad mitogénica para fibroblastos, y es el responsable de la interacción con fibronectina⁹⁶.

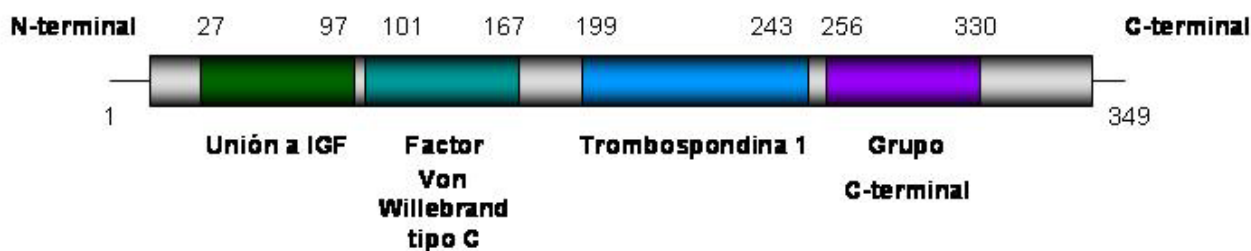


Figura 7: Estructura la proteína CCN2/CTGF. Los residuos están numerados de acuerdo con la proteína humana. Los 38 residuos de cisteínas se conservan en todos los miembros de la familia excepto en WISP-1/CCN4.

Todas las proteínas de la familia CCN presentan además 38 residuos de cisteína que se agrupan en dos segmentos (22 en la región N-terminal y 16 en la C-terminal), característico de otros factores de crecimiento, como PDGF, el factor de crecimiento del nervio y TGF- β ^{17,178}. Estas regiones conservadas en la proteína se reflejan en la organización genómica de la familia de genes, la cual comprende 5 exones con tamaños constantes y 4 intrones de tamaño variable^{77,261}. Los 5 exones codifican los 4 módulos de las proteínas y el primer exón codifica el péptido señal²¹⁹.

A pesar de esta homología en las regiones de codificación existen diferencias en el promotor y en las regiones 3' sin traducir, lo que confiere diferencias en la regulación de la expresión de estas proteínas²¹⁹. La variedad en la región 3' sin traducir determina la vida media del ARNm, debido a la presencia de motivos AUUUA que se caracterizan por conferir inestabilidad al ARNm²¹¹.

3.2. Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF).

CTGF es una proteína rica en cisteína de 349 aminoácidos y un peso molecular de 38 KDa. Fue identificada en el medio condicionado de células endoteliales de vena de cordón umbilical²³. Utilizando diferentes técnicas de clonación se aisló CTGF de ratón en células NIH3T3 estimuladas con suero¹³⁶ y en células AKR-2B estimuladas con TGF- β ¹³⁹. El gen de CTGF humano se localiza en el cromosoma 6q23.1⁹⁴, y el de ratón en la posición 10A3-10B1²⁸.

En el promotor de CTGF se ha descrito un elemento de respuesta a TGF- β localizado entre las posiciones -162 y -128 fundamental en la regulación de la expresión basal de CTGF. TGF- β incrementa la actividad del promotor de CTGF asociado a luciferasa en fibroblastos transfectados, y mutaciones en este elemento producen una pérdida de la inducción causada por TGF- β ⁷⁷. Otros autores han descrito un elemento de unión a Smad en el promotor de CTGF necesario para su inducción por TGF- β ⁹⁴; y estudios moleculares recientes han revelado la presencia de un sitio de unión NF κ B altamente conservado en la región proximal del promotor de CTGF³⁸.

La expresión de CTGF está aumentada en muchas enfermedades, incluyendo desordenes de la piel, aterosclerosis y enfermedades renales^{18,19}. CTGF tiene propiedades multifuncionales que incluyen

la regulación y síntesis de MEC^{141,263}, migración de células endoteliales y angiogénesis, regulación del ciclo celular²⁴¹, apoptosis de células mesoteliales²³³, supervivencia de células hepáticas y mesangiales^{74,245}, proliferación y diferenciación de fibroblastos y condrocitos^{106,160,178,262}. Se ha descrito que ratones deficientes en CTGF exhiben dimorfismo esquelético con disminución de la expresión de componentes de matriz extracelular en el cartílago¹⁰⁶.

Dependiendo del tipo celular, una gran variedad de factores y moléculas están implicadas en la regulación de la expresión de CTGF y en la modulación de sus respuestas (Figura 8). Los agonistas de receptores acoplados a proteínas G, factores de crecimiento como TGF- β , AngII, la proteína morfogenética del hueso (BMP), VEGF, IGF, el factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), la Interleuquina-4 (IL-4), altas concentraciones de glucosa, hipoxia, estrés mecánico y estrés oxidativo aumentan rápidamente la expresión de CTGF^{8,40,96,131,154,171,187,190,272}. Sin embargo, otros factores como TNF- α , AMPc y el tratamiento con agonistas de receptor activado por la proliferación de peroxisomas- γ (PPAR- γ) inhiben la expresión de CTGF inducida por TGF- β en algunos tipos celulares^{1,52,68,247}.

Diversos mecanismos de señalización se han relacionado con el aumento de CTGF, entre ellos se encuentran la vía de señalización de las proteínas Smad, las especies reactivas de oxígeno (ROS), RhoA, proteína quinasa C (PKC), la quinasa Janus (JAK), PI3K y MAPK^{41,107,124,242}.

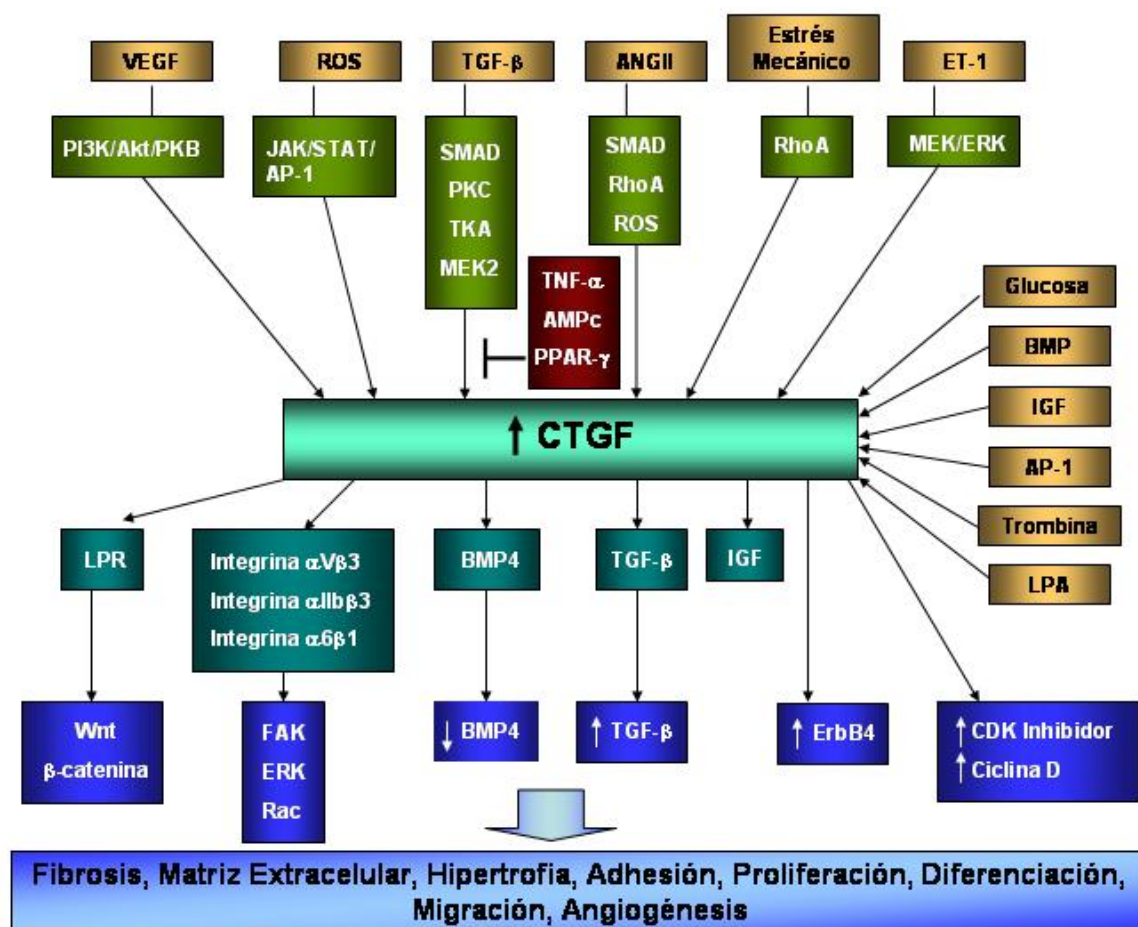


Figura 8: Moléculas efectoras y rutas de señalización implicadas en la regulación de CTGF y sus acciones. Las siglas empleadas se encuentran definidas en el texto o en el apartado de abreviaturas.

Es poco lo que se conoce a cerca de los receptores de CTGF. Los primeros estudios de interacción revelaron que existen complejos receptor-CTGF con un peso molecular de unos 280 KDa en condrocitos, osteoblastos y células endoteliales¹⁶⁶. CTGF se une al receptor macroglobulina de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR)²¹⁷. En diversos tipos celulares, CTGF actúa a través de su unión a diversas integrinas, como la integrina $\alpha 5 \beta 1$ o $\alpha 11 \beta 3$, y a receptores de proteoglicanos heparan sulfato, activando varias quinasas como la quinasa de adhesión focal (FAK), ERK y Rac^{8,39,73,110}. A través de su dominio rico en cisteínas se une de forma directa a BMP-4 y TGF- β^2 , por su dominio CT interacciona con fibronectina⁹⁶, y mediante el dominio amino terminal se une a IGF¹¹⁴. En células mesangiales humanas CTGF interacciona con el sistema dual de receptores Tirosina quinasa A (RTK-A) y p75_{NTR} que participa en la transducción de señales de neurotrofina. Los receptores de tirosina quinasas unen gran cantidad de proteínas adaptadoras y activan múltiples vías de señalización intracelular, lo que estaría en concordancia con las propiedades multifuncionales de CTGF²⁴⁴.

3.3. Papel de CTGF en el Daño Renal.

En el riñón, se ha observado una expresión elevada de CTGF en desordenes proliferativos o lesiones fibróticas y en varias enfermedades renales experimentales y humanas, incluyendo glomerulonefritis, glomeruloesclerosis y nefropatía diabética^{82,104,105,136,188}. Los niveles de expresión de CTGF se correlacionan con la severidad y progresión de la fibrosis renal^{104,105}.

En un modelo de nefrectomía 5/6 en ratas el aumento de CTGF, TGF- β y PDGF en fibroblastos intersticiales se correlacionó con el aumento de la fibrosis y la severidad del daño renal, lo que pone de manifiesto que CTGF participa junto a otros factores en el desarrollo y la progresión de la fibrosis tubulointersticial⁶⁷. Mediante estudios *in vitro* se ha descrito que CTGF está asociado con la hipertrofia de las células mesangiales y la producción de matriz²⁴⁹.

Estudios recientes han demostrado que CTGF también juega un papel clave en la TEM durante la fibrosis tubulointersticial¹⁴⁷. CTGF promueve transdiferenciación de células tubuloepiteliales humanas a miofibroblastos *in vitro* y el bloqueo de CTGF da lugar a la inhibición de la transdiferenciación inducida por TGF- β ²⁶⁹ y por productos terminales de glicosilación avanzada²⁹. Estos efectos *in vitro* se correlacionan con el hecho de que *in vivo* el incremento de la expresión de CTGF en el riñón diabético colocaliza sobre el epitelio tubular en sitios de TEM²⁹.

4. FAMILIA DE CITOQUINAS INTERLEUQUINA 1.

La familia de citoquinas IL-1 incluye once miembros, entre los que destacamos interleuquina-1 α (IL-1 α), interleuquina-1 β (IL-1 β) y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), por tener gran importancia en la progresión del estado patológico. Existe una fuerte homología entre IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra, contienen entre un 18-26 % de aminoácidos idénticos. Además la forma murina y humana de la IL-1 β son idénticas en aproximadamente un 78%. Los genes que codifican para estas tres proteínas se sitúan cercanos en la región 2q14 en el cromosoma y son bastante similares, indicando un posible

origen por duplicación génica¹⁷⁴. IL-1 β es un polipéptido no estructural con una masa molecular de 15 KDa, que originalmente fue estudiada como el primer pirógeno endógeno productor de fiebre, y su cDNA se clonó en 1984⁴⁸.

Tanto la IL-1 α como IL-1 β son sintetizadas como un péptido precursor que es procesado para generar una proteína madura de 17 KDa. IL-1 β es principalmente producida por macrófagos y es secretada tras liberarse de su pro-forma por acción de una cistein-proteasa llamada caspasa-1 (también se conoce como enzima convertidora de IL-1)¹⁰⁸. Por su parte pre-IL-1 α es cortada por calpaina para liberar la IL-1 α carboxi-terminal madura¹⁸¹. La biosíntesis de IL-1 β es compleja y está regulada en múltiples niveles. La mayoría del conocimiento de los mecanismos de producción de IL-1 β derivan de estudios *in vitro* con células periféricas, principalmente monocitos y macrófagos, en los que la biosíntesis de IL-1 β se produce tras la activación del receptor parecido a Toll-4 (TLR4) tras estimular con lipopolisacárido bacteriano (LPS)²²³.

4.1. Receptores de la Familia de Interleuquina-1.

La familia de receptores de IL-1 incluye tres miembros, receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI), el receptor de IL-1 de tipo II (IL-1RII) y la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAcP), que son capaces de unirse a IL-1 α , IL-1 β y IL-1Ra. Todos estos receptores pueden encontrarse asociados a membrana o de forma soluble tras la liberación de la fracción extracelular por rotura enzimática. El IL-1RI y IL-1RAcP tienen dominios citoplasmáticos que están relacionados con la superfamilia de los receptores parecidos a Toll (TLR), llamados dominios del receptor de IL-1 parecidos a Toll (TIR).

Cuando IL-1 se une al receptor IL-1RI, se activan señales intracelulares que transducen la señal. Por el contrario, IL-1RII actúa como un receptor señuelo en la superficie de la célula o en forma soluble³⁹ (Tabla1).

Nombre	Ligando	Expresión
IL-1RI soluble y de membrana	Inicia y amplifica la respuesta inflamatoria e inmune tras la activación de IL-1 α e IL-1 β . Es bloqueado tras su unión a IL-1Ra. La forma soluble se une a IL-1F10.	Expresado por todas las células que responden a IL-1. Receptor mayoritario en las células T, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales.
IL-1RII soluble y de membrana	Se une a IL-1 β y con menor eficiencia a IL-1 α e IL-1Ra. Es un receptor señuelo incapaz de iniciar la transducción de la señal. Tanto la forma soluble como la de membrana tienen actividad inhibitoria.	Expresado en muchos tipos celulares, principalmente células B, fagocitos mononucleares, leucocitos polimorfonucleares y células de médula ósea.
IL-1RAcP soluble y de membrana	Co-receptor de IL-1RI responsable de la señalización tras la unión de IL-1 α o IL-1 β . Puede formar complejos inactivos con IL-1RII.	Expresado por todas las células que responden a IL-1.

Tabla 1: Familia de receptores de IL-1.

Los miembros de la familia de IL-1, presentan diferente afinidad por los distintos receptores. La interacción de IL-1 β con el receptor IL-1RII supone una unión casi irreversible llevando a la inhibición natural de la señalización de IL-1 β . Del mismo modo, IL-1Ra tiene una gran afinidad por el receptor IL-1RI, convirtiéndolo en un inhibidor endógeno de IL-1¹⁰⁸.

4.2. Mecanismo de transducción de la señal de Interleuquina-1.

Cuando IL-1 se une a su receptor IL-1RI se forma un complejo trimérico de alta afinidad con la proteína accesoria IL-1RAcP. Los dominios intracelulares de cada receptor forman un heterodímero que activa la transducción de la señal de IL-1 (Figura 9).

El dominio TIR de la molécula adaptadora MyD88 interacciona con los dominios TIR de IL-1RAcP y recluta a las quinasas IRAK-4 e IRAK-1 a través de la interacción con dominios de muerte y el factor asociado al receptor de TNF-6 (TRAF-6), formando el complejo receptor.

La fosforilación de IRAK permite la formación de un complejo que es liberado del receptor de IL-1 e interacciona con la quinasa activada por TGF- β 1 (TAK-1) y la proteína de unión a la quinasa activada por TGF- β 1 y 2 (TAB-1 y TAB-2). La activación de la quinasa TAK-1 en el citoplasma supone la activación de IKK, la fosforilación y degradación de I κ B y la activación de NF κ B. La activación de TAK-1 también participa en la activación de MAPK. La activación de todas estas vías de señalización intracelular deriva en la activación de la transcripción de genes implicados en el proceso patológico que llevan al estado inflamatorio.

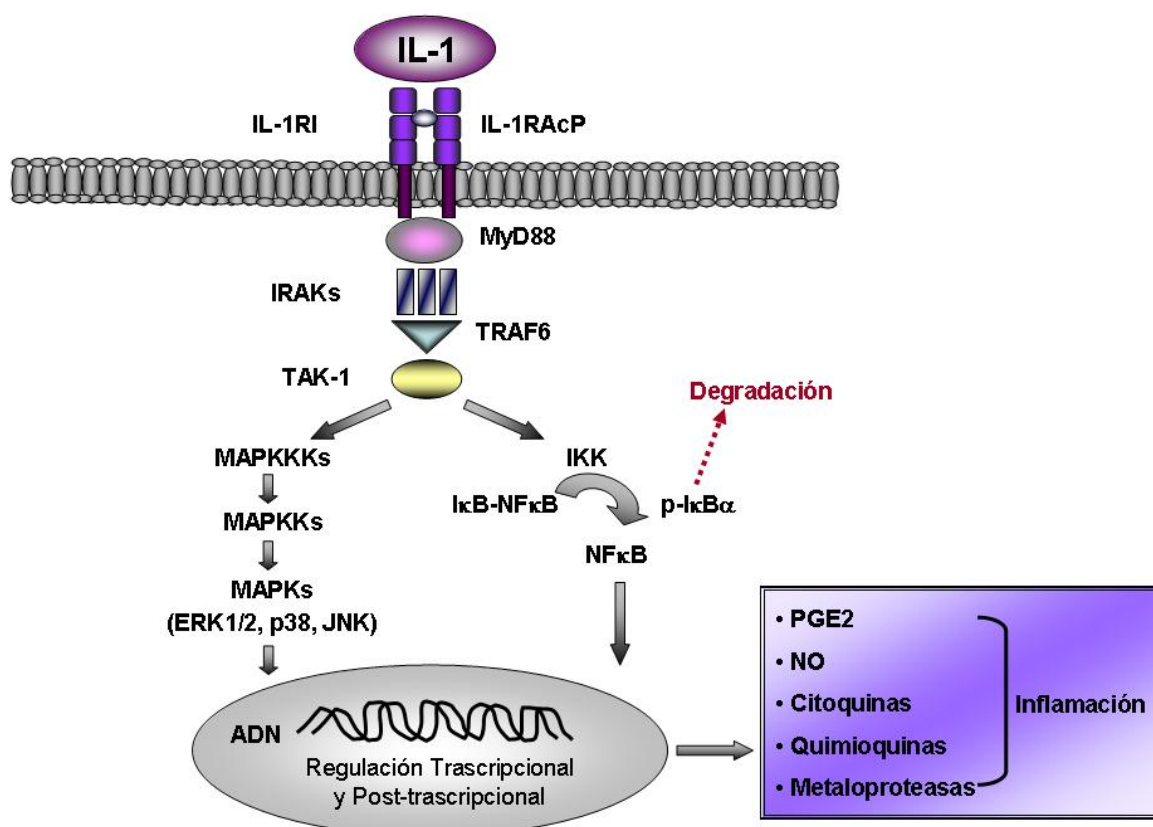


Figura 9 : Transducción de la señal de la Interleuquina 1.

4.3. Interleuquina-1 en el Daño Renal.

La IL-1 β es una importante citoquina con una gran variedad de actividades biológicas⁴⁸, implicada en el daño renal y en la reparación^{101,249}. En células mesangiales, IL-1 β regula el crecimiento celular y la expresión de factores inflamatorios y proteínas de matriz extracelular^{46,103,175,194,197}.

El aumento en la expresión de IL-1 β ha sido descrito en varios modelos de daño renal experimentales y en enfermedades humanas^{234,240,249}. La IL-1 β estimula un gran número de tipos celulares activando la síntesis de citoquinas inflamatorias y quimioquinas como IL-6, TNF- α , interferón gamma (IFN- γ), IL-8/CXCL1, y MCP-1. Estos mediadores inducen la infiltración de células inflamatorias y ejercen efectos pleiotrópicos en diversas enfermedades de carácter inflamatorio. La cascada inflamatoria se define como la expresión secuencial de citoquinas y quimioquinas, la infiltración de células inflamatorias y la consiguiente destrucción del tejido y progresión de la enfermedad⁷¹.

Muchos estudios han intentado esclarecer la secuencia de expresión de citoquinas y quimioquinas durante el proceso inflamatorio. En un estudio realizado utilizando un modelo de daño renal causado por isquemia-reperfusión se sugiere que la IL-1 β actúa como iniciador y amplificador de la expresión de quimioquinas, lo cual favorece la infiltración de células inflamatorias⁷¹. Aunque el efecto directo *in vivo* de IL-1 β en el riñón no ha sido evaluado, varios estudios han demostrado que la IL-1 β participa en la respuesta inflamatoria temprana y se ha observado que el bloqueo de los receptores de IL-1 β tiene efectos protectores^{234,240,249}. En la nefritis causada por anti-Thy 1, el bloqueo del receptor de la IL-1 β , redujo la proliferación de células mesangiales y la acumulación de macrófagos en la región glomerular²³⁴.

Estudios *in vitro* en células renales demuestran que la IL-1 β puede mediar diferentes respuestas dependiendo del tipo celular; en células tubuloepteliales esta citoquina participa en la transición mesenquimal a través de TGF- β y la regulación de MEC^{60,240}.

5. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.

5.1. Vía de Señalización del Factor Nuclear Kappa B (NF κ B).

NF κ B fue inicialmente identificado en el promotor del gen de la cadena ligera de inmunoglobulinas de linfocitos. Se trata de un factor de transcripción de respuesta rápida presente en todos los tipos celulares, que responde ante una gran variedad de estímulos como por ejemplo productos virales o bacterianos, citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β , estrés intracelular como una sobrecarga proteica en el retículo endoplásmico, y estrés extracelular como por ejemplo la luz ultravioleta y el peróxido de hidrógeno^{22,80}.

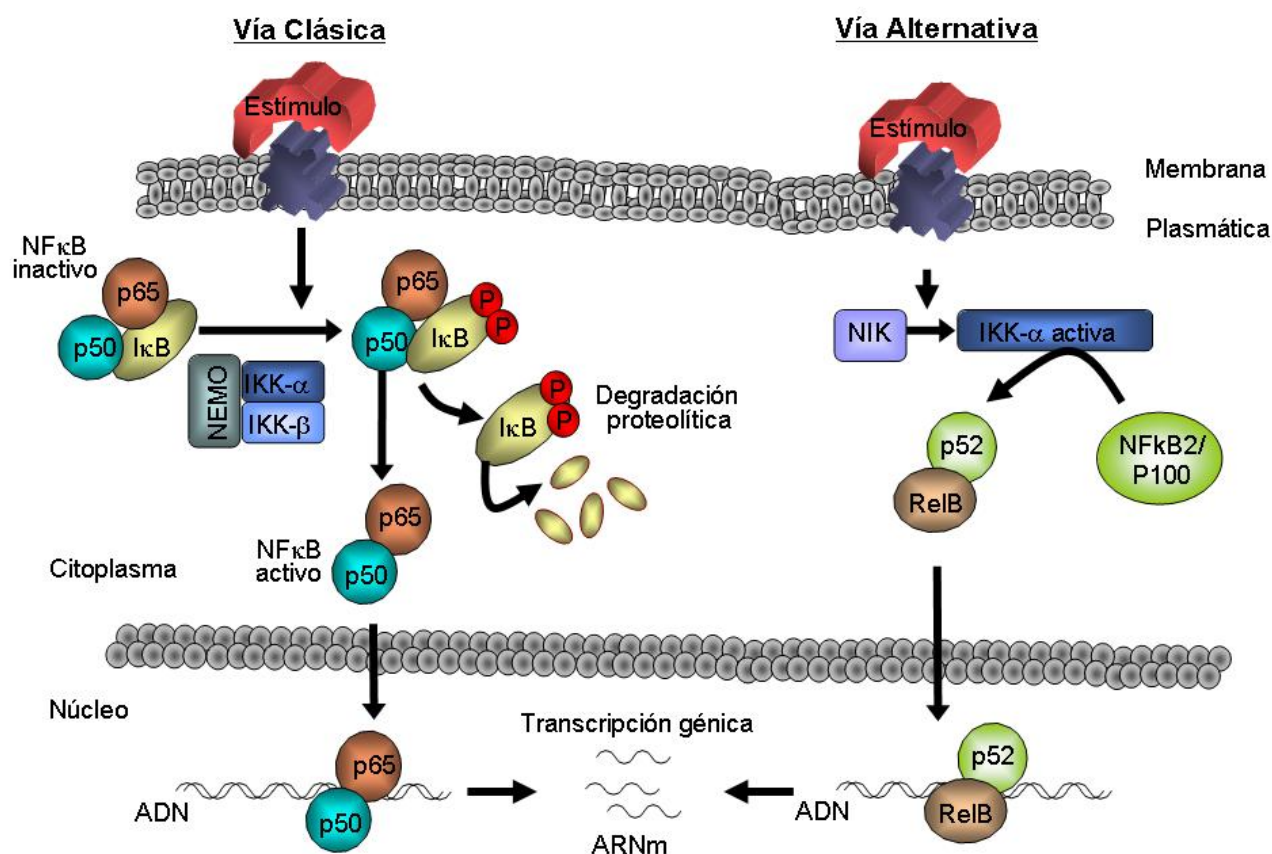


Figura 10: Esquema representativo de la vía clásica y alternativa de activación de NFκB. A la izquierda se muestra un esquema representativo de la vía clásica de activación del factor NFκB, y a la derecha la vía alternativa de activación.

En mamíferos NFκB se encuentra en forma de homodímeros o heterodímeros de cinco miembros identificados: p50, p65 (RelA), c-Rel, p52 y RelB; que están en el citoplasma en forma latente unidos a una subunidad inhibidora llamada IκB (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBδ, IκBε y Bcl-3)^{22,80}. Todas estas proteínas comparten una región homóloga altamente conservada de unos 300 aminoácidos, que se considera la región responsable de la dimerización, la unión al ADN y la interacción con la subunidad inhibitoria. El dímero más abundante en la mayoría de los tipos celulares y por tanto el más estudiado es el formado por p50/p65, que está predominantemente unido a la proteína inhibitoria IκBα. La activación de NFκB puede producirse por 3 mecanismos (Figura 10): 1) Vía Clásica: virus y citoquinas activan las quinasas IKKs (IKKα, IKKβ y la subunidad reguladora NEMO), que inducen la fosforilación y degradación de IκB y se produce la activación del complejo NFκB (p65:p50) y da lugar a la respuesta inflamatoria^{80,151}. 2) Vía Alternativa: caracterizada por el procesamiento de NFκB2/p100 dependiente de la activación de quinasas IKK-α por la quinasas inductoras de NFκB (NIK), dando lugar al complejo p52/RelB, y activando señales relacionadas con la apoptosis²²⁴ 3) Vía denominada CK2, que es independiente de IKK⁸⁴.

En la vía clásica, tras la llegada del estímulo, se produce la activación de las quinasas encargadas de la fosforilación de IκB (IKKα e IKKβ), en los residuos serina 32 y 36 que marcan esta proteína para ser reconocida por el complejo proteína ligasa-ubiquitina (Figura 10). Esta enzima poliubiquitina a IκB en las lisinas 21 y 22, lo que supone su degradación por el proteasoma 26S. Este proceso permite el

desenmascaramiento de las secuencias de reconocimiento nuclear de NF κ B resultando en su traslocación al núcleo. Allí es capaz de activar la transcripción de genes diana debido a la unión a los elementos de alta afinidad κ B en sus promotores y la formación de complejos con varios coactivadores^{22,80,151}. Entre los genes que regula NF κ B podemos destacar genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria y en el remodelado tisular como las metaloproteasas (MMPs), VCAM-1, MCP-1, TNF- α , IL-6 y enzimas como la fosfolipasa 2A y ciclooxigenasa^{50,113,143,180,205,237,265}. NF κ B participa en la regulación de otros procesos como la proliferación celular y la apoptosis en diversos tipos celulares. El aumento en la expresión de la quinasa MEKK3 causa la activación de NF κ B, la cual contribuye al aumento de factores de supervivencia celular dando como resultado resistencia a la apoptosis²¹². Además en células tubuloepteliales renales la apoptosis disminuye al reducir la activación de NF κ B¹⁴⁴. En modelos experimentales de hipertensión se ha observado que la activación de NF κ B esta correlacionada con el incremento en el número de linfocitos intersticiales y la presencia de células apoptóticas¹⁸⁵. La inhibición de esta ruta de señalización mediante el empleo de Parthenolide (inhibidor de la fosforilación de I κ B), produce una mejora en la inflamación renal en modelos de glomerulonefritis inmune y obstrucción unilateral del uréter (UUO)^{59,133}.

5.2. Ruta de Proteínas Quinasas activadas por Mitógenos (MAPK).

Las MAPK pertenecen a una familia de serina treonina quinasas que intervienen en diversos procesos celulares como crecimiento celular, proliferación, muerte y diferenciación en respuesta a varios estímulos¹⁷⁶. Las MAPK se dividen en tres familias (Figura 11):

- Quinasa regulada por señales extracelulares (ERK: ERK1 y ERK2).
- Quinasa NH₂ –terminal jun (JNK: JNK1, JNK2 y JNK3).
- Familia p38.

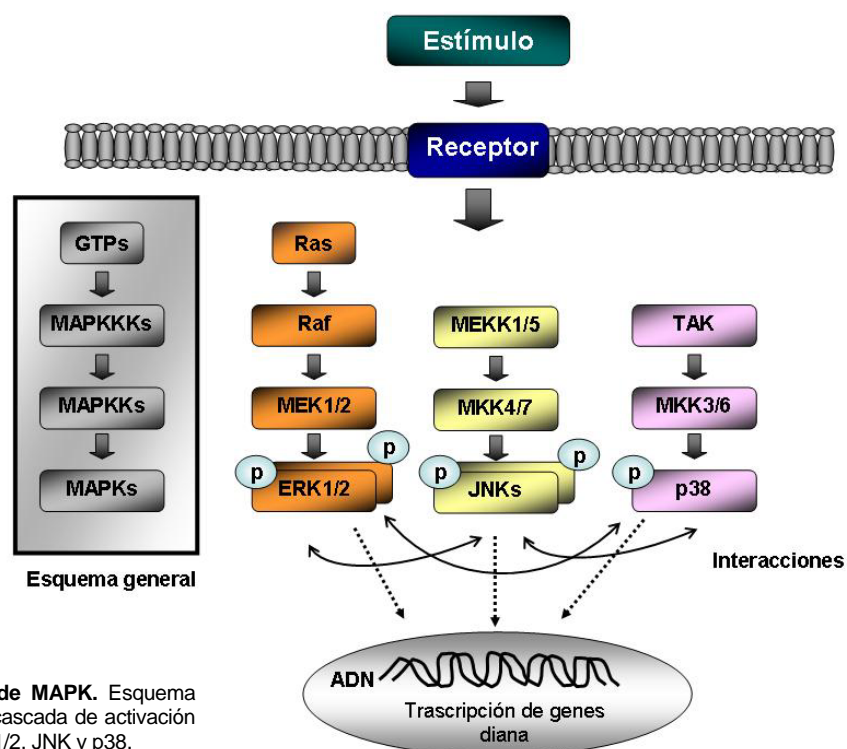


Figura 11: Familia de MAPK. Esquema representativo de la cascada de activación de las quinasas ERK1/2, JNK y p38.

La activación de las MAPK tiene lugar a través de una cascada de señalización lineal en la cual la quinasa de la quinasa de MAPK (MAPKKK) fosforila y activa a la quinasa de MAPK (MAPKK) y esta a su vez fosforila y activa a la MAPK correspondiente, que conservan un motivo con tres aminoácidos Thr-X-Tyr que da lugar a un incremento en la actividad catalítica de las MAPK^{89,176}. Estas quinasas son activadas por diversos factores, algunos de los cuales están implicados en la patogenia del daño renal como AngII, TGF- β e IL-1 β ^{75,78,97,112,170,251,260,269}.

5.2.1. Vía de Señalización de la Quinasa regulada por señales extracelulares (ERK).

La vía de señalización de ERK generalmente es activada por receptores tirosina quinasas o por receptores acoplados a proteínas G. Las principales ERK de mamíferos son p44 (ERK1) y p42 (ERK2), las cuales son activadas mediante fosforilación por MEK1 y MEK2. Los efectores de esta ruta son factores de transcripción (como Elk-1 y Ets-1), enzimas (como la fosfolipasa A2) y receptores de superficie celular y receptores nucleares (como por ejemplo el receptor de EGF). ERK desempeña un papel fundamental en el desarrollo embrionario ya que regula procesos clave como la mitogénesis y la diferenciación celular²³⁶. ERK1/2 interviene en la activación de la apoptosis a través de la activación de la caspasa-3²⁷³.

En diversas glomerulopatías humanas la activación de la ruta de señalización ERK1/2 se correlaciona con proliferación celular, lesiones histológicas y disfunción renal, además de promover reparación renal a través de la proliferación tubular y de los miofibroblastos intersticiales¹⁴⁰. En modelos experimentales de daño renal, se ha descrito que la activación de ERK1/2 participa en el daño renal causado por AngII¹⁹. El bloqueo farmacológico de la activación de esta quinasa previene la proliferación celular exagerada que se produce en modelos experimentales de glomerulonefritis mesangioproliferativa¹⁴. En fibroblastos renales la aldosterona incrementa la producción de colágenos tipo I, III, y IV a través de la activación de esta ruta de señalización¹⁵⁵. En células tubuloepteliales humanas TGF- β induce CTGF a través de la activación de su vía de señalización intracelular clásica, la ruta de las proteínas Smad y a través de Ras/MEK/ERK¹⁷⁹; y en células mesangiales TGF- β activa ERK y media la expresión de MCP-1⁴³.

5.2.2. Vía de señalización de la Quinasa NH₂-terminal de Jun (JNK).

La vía de señalización de JNK o también llamada proteína quinasa 1 activada por estrés (SAPK-1) es activada por estímulos estresantes para la célula como por ejemplo la luz ultravioleta, la hipertonidad, el estrés causado por choque térmico y por supuesto la presencia de citoquinas proinflamatorias en el entorno celular. Los miembros de esta familia son tres: p46 (JNK1), p54 (JNK2) y p49 (JNK3). Sus efectores son principalmente factores de transcripción como Elk-1, c-jun, NFAT4 y p53. Entre los procesos que regula están la tumorigénesis, la apoptosis y la inflamación²³⁶.

La activación de JNK ha sido descrita en modelos experimentales de glomerulonefritis, en podocitos, células endoteliales glomerulares, macrófagos, células T y fibroblastos. En este modelo, el tratamiento con un inhibidor específico de la quinasa JNK redujo la proteinuria y el daño glomerular e intersticial^{65,226}. En ratones sometidos a UUO, el bloqueo de JNK1/2 disminuyó la acumulación de miofibroblastos intersticiales, la síntesis de colágeno IV y la apoptosis celular. Esta disminución en la

fibrosis y la apoptosis en el riñón obstruido también se observó en ratones deficientes en JNK1 y JNK2 sometidos a UUO¹³⁵. El bloqueo de JNK también redujo la apoptosis de las células tubuloepteliales renales en un modelo de isquemia reperusión²⁴⁸.

En células tubuloepteliales en cultivo, la producción de IL-6 inducida por citoquinas inflamatorias es regulada por JNK1/2⁸⁵. Además la IL-1 induce la producción de ácido araquidónico y la inducción de óxido nítrico sintasa a través de la activación de la vía de señalización JNK/SAPK^{78,97}. En células mesangiales, AngII induce la activación de TGF- β latente a vía trombospondina en un mecanismo que implica la activación de la ruta JNK1/2¹⁵⁶.

5.2.3. Vía de Señalización de la Quinasa p38.

La familia de p38 incluye cuatro miembros ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) que son activadas mediante fosforilación por las quinasas MKK3 y MKK6. De estos cuatro miembros p38 α y p38 β son los más ampliamente expresados en gran variedad de tejidos, siendo junto con p38 δ las isoformas mayoritarias en riñón^{142,161}. Los miembros de esta familia, al igual que ocurre con los de la familia JNK, son activados en respuesta al estrés celular. Entre sus efectores se encuentran reguladores de la respuesta al estrés, factores de transcripción y enzimas^{142,236}.

La quinasa p38 desempeña un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos como la diferenciación celular y la progresión del ciclo celular, además de intervenir activamente en el desarrollo de procesos patológicos como la respuesta inflamatoria y fibrótica. La quinasa p38 renal es activada durante el shock hemorrágico promoviendo la expresión de citoquinas inflamatorias en el riñón y desarrollando disfunción renal²¹⁵. En células mesangiales la activación de ERK y p38 media la expresión de MCP-1 causada por TGF- β ⁴³. Además la activación de p38 es necesaria para la producción de MCP-1 inducida por IL-1 β ¹⁹⁶. Estudios en biopsias de pacientes con glomérulo nefritis han demostrado que la activación de p38 en las células renales residentes e infiltrantes se correlaciona con la disfunción renal, aumento en la proteinuria, lesiones proliferativas y necróticas e inflamación intersticial²²⁷. En cuanto a su participación en la respuesta fibrótica recientemente ha sido demostrado que en células epiteliales de túbulo proximal humanas la producción de fibronectina inducida por TGF- β es dependiente de la quinasa p38¹⁶⁴. Además el bloqueo de p38 inhibe la activación de la expresión génica de fibronectina en células mesangiales, previniendo el desarrollo de la fibrosis renal⁹³. El bloqueo de p38 mejora la supervivencia, reduce la fibrosis cardíaca y renal, la expresión de CTGF, TNF- α , IL-6 y la infiltración de macrófagos en ratas dobles transgénicas para el gen de la renina y el angiotensinógeno humano (dTGRs)¹⁷⁰. En ratas con daño renal causado por la activación exacerbada del SRA, el bloqueo de p38 disminuyó la producción del marcador de daño renal Kim-1¹⁸.

En los últimos años nuevas estrategias están siendo diseñadas para dirigir el bloqueo de esta quinasa solo en las células en las que su activación contribuye al avance del proceso fibrótico. El desarrollo de un conjugado formado por un inhibidor de la quinasa p38 (SB202190) y una lisozima, que lo internaliza en la célula tubuloeptelial de forma específica e inhibe la fosforilación de p38, redujo el daño en un modelo de isquemia reperusión¹⁸³. Todos estos datos sugieren que p38 puede ser un buen candidato a ser modulado terapéuticamente en el tratamiento de la fibrosis renal.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de esta tesis es investigar los mecanismos moleculares implicados en la regulación y las acciones del Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF) en la patogenia del daño renal.

OBJETIVOS CONCRETOS

- I. Estudiar la regulación de CTGF y su conexión con otros factores implicados en el proceso inflamatorio y fibrótico asociados al daño renal. Para ello hemos utilizado un modelo experimental de daño renal causado por infusión sistémica de Angiotensina II en ratas, y estudios *in vitro* en células mesangiales de rata.
- II. Investigar los mecanismos intracelulares que regulan la síntesis de CTGF y sus respuestas fibróticas *in vitro*, estudiando la implicación de diversas vías de señalización y el efecto de la presencia simultánea de factores inflamatorios y fibróticos.
- III. Definir las acciones de CTGF *in vivo* en el riñón. Para desarrollar este objetivo, hemos realizado un modelo agudo de administración sistémica de CTGF en ratones.
- IV. Estudiar las vías de señalización intracelulares activadas por CTGF y su implicación en las respuestas inducidas por este factor.

Materiales y Métodos

1. MODELOS EXPERIMENTALES.

1.1. Modelo experimental de infusión sistémica de AngII en rata.

Para realizar este modelo experimental hemos utilizado ratas macho Sprague-Dawley normotensas de 3 meses de edad (150-180g). El daño renal se indujo mediante la infusión sistémica de AngII utilizando minibombas osmóticas (Alza Corp. Mod 2001), que la liberan a velocidad y concentración constante de 50 ng/Kg/min, y que se implantaron subcutáneamente en el lomo de los animales a través de una pequeña incisión. La dosis empleada de AngII es similar a las descritas previamente²⁰¹. Como control se incluyó un grupo infundido con salino (vehículo). Los animales se sacrificaron tras 3 días, 1 y 2 semanas de infusión (Figura 12). La presión arterial sistólica fue medida en ratas conscientes con un esfigmomanómetro en la vena dorsal de la cola (NARCO Biosystems). El valor de la presión sanguínea para cada rata fue calculado como la media de tres medidas separadas en cada sesión.

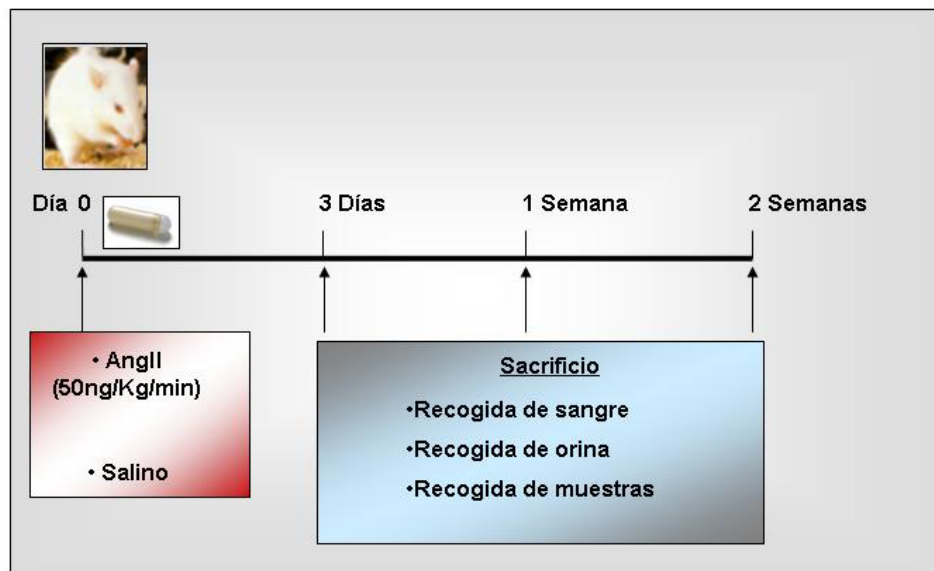


Figura 12: Esquema del protocolo experimental del Modelo de Infusión sistémica de AngII en ratas Sprague-Dawley.

1.2. Modelo experimental de administración sistémica de CTGF en ratón.

Para la realización de este modelo experimental hemos empleado ratones macho de la cepa C57BL6 de 9 a 12 semanas de edad y unos 20 gramos de peso, que fueron adquiridos a Harlan Interfauna Ibérica, S.A. (Barcelona, España). Algunos los ratones se les administró una única dosis de CTGF a 2,5 ng/g de peso (MBL Internacional) o salino (administración intraperitoneal en todos los casos). Para evaluar el papel de la vía de señalización de NF κ B en las acciones de CTGF en el riñón, algunos animales fueron tratados con 3,5 mg/g/día de Parthenolide (inhibidor de NF κ B, Sigma) o su vehículo (0.05% DMSO) 24 horas antes de la inyección con CTGF. Los grupos de estudio se distribuyeron de la siguiente forma (Figura 13):

- **Grupo 1: Control: Vehículo (DMSO 0.05%) + salino**
- **Grupo 2: Vehículo (DMSO 0.05%) + CTGF**
- **Grupo 3: Parthenolide + CTGF**
- Grupo 4: Salino
- Grupo 5: Salino + CTGF
- Grupo 6: Parthenolide + Salino

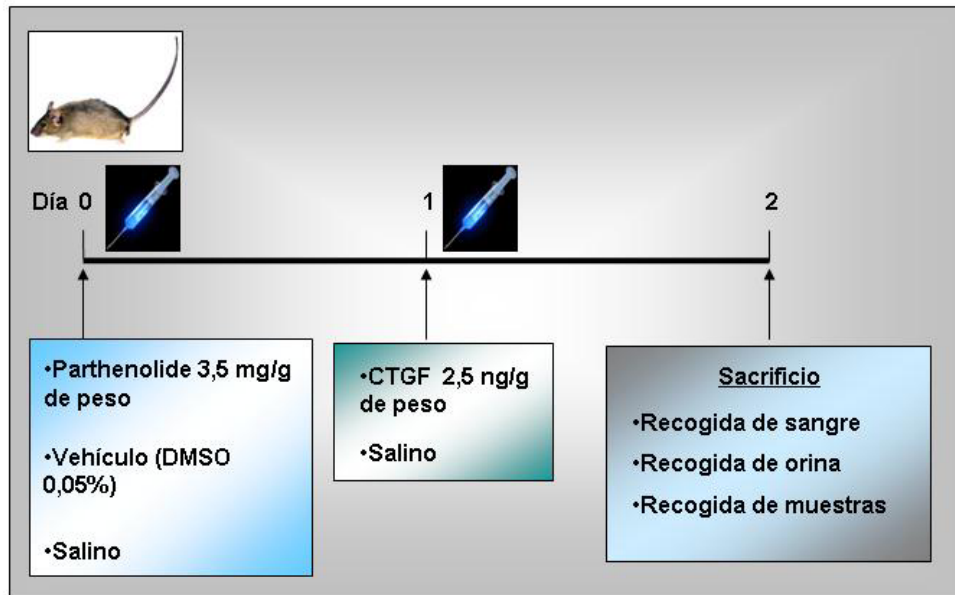


Figura 13: Esquema del Modelo Agudo de administración sistémica de CTGF en ratones C57BL6.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 7. Las dosis de CTGF empleadas fueron calculadas de acuerdo con la usada en los experimentos *in vitro*. La dosis de Parthenolide se determinó en base a estudios previamente publicados¹³³. Los datos mostrados en esta tesis representan como grupo control al **grupo 1** (DMSO 0.05% seguido de salino) y el **grupo 2** como grupo de estudio del efecto de CTGF (DMSO 0.05% seguido de CTGF). Además se realizaron controles adicionales para evaluar el efecto de los vehículos e inhibidores utilizados. No se observaron diferencias en los parámetros bioquímicos y de lesión renal entre los grupos 4, 6 y 1 (este último utilizado como control). Los efectos renales causados por CTGF fueron similares tanto en el grupo 2 (DMSO) como en el grupo 5 (salino).

En ambos modelos, el día del sacrificio, se recogió sangre y orina de cada animal para determinar los niveles de urea y creatinina en plasma, y creatinina y proteinuria en orina. Los riñones fueron perfundidos con salino frío antes de extirparlos. Una parte del riñón de cada animal se fijó en paraformaldehído durante 24 horas y después se pasaron a etanol al 70% y se incluyeron en parafina para usarlo para técnicas de histología. El resto del tejido se congeló en nitrógeno líquido para realizar los estudios génicos y proteicos. Todos los procedimientos con los animales se realizaron de acuerdo a la normativa Internacional vigente (B.O.E. 223/1988 y 265/1990), aprobada por el comité ético de nuestra institución.

2. CULTIVOS CELULARES.

2.1. Cultivo primario de células mesangiales de rata.

Las células mesangiales (CM) fueron obtenidas del riñón de ratas hembras Wistar Kyoto de 150-180 gramos. Los animales fueron anestesiados y se les extrajeron los dos riñones que fueron depositados en un recipiente con salino frío y estéril. A continuación, el protocolo se desarrolló en condiciones de esterilidad en una campana de cultivos. Los riñones fueron decapsulados y la zona de la corteza renal fue cortada en trozos pequeños y depositados en otro recipiente con salino frío y estéril. La corteza renal troceada se pasó secuencialmente por dos tamices de 150 y 50 μm de poro respectivamente. El homogeneizado resultante se incubó con 500 U/ml de colagenasa tipo IA (Sigma) durante 25 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 2 mmol/L de glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina (Gibco), y 20% de suero de ternera fetal (STF) (Gibco) previamente inactivado por calor (decomplementado: 56°C durante 30 minutos). Se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm, y el pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo, y se sembró en placas de 100x20 mm. Las células permanecieron en incubación a 37°C en una estufa humidificada y con atmósfera de 5% de CO_2 . Al llegar a la semiconfluencia, las células fueron incubadas durante 48 horas en medio RPMI al 0,5% de STF antes de realizar los diferentes experimentos.

La caracterización de las CM se realizó por microscopia de contraste de fase⁵³, observándose la morfología característica de estas células, con prolongaciones citoplasmáticas y núcleo irregulares. No se apreciaron formas características de células endoteliales o epiteliales glomerulares. Además, mediante inmunocitoquímica, las células presentaron tinción positiva para desmina y α -actina (marcadores característicos de estas células, Sigma), y tinción negativa para citoqueratina (Sigma) y el antígeno relacionado con el factor VIII (Dako), excluyendo contaminación endotelial y epitelial respectivamente (datos no mostrados). También se excluyó la contaminación por macrófagos¹⁴⁶.

2.2. Línea de células tubuloepiteliales proximales humanas (HK-2).

Las células HK-2 (células tubuloepiteliales proximales humanas immortalizadas), fueron cultivadas en medio RPMI con 10% de STF decomplementado, suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales, 100U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, ITS (5 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma) e hidrocortisona (36ng/mL) (Sigma) en una atmosfera con 5% de CO_2 y 37°C. Cuando las células se encuentran al 60-70% de confluencia en la placa, son privadas de suero 24 horas antes de realizar los experimentos.

2.3. Línea de células tubuloepiteliales proximales murinas (MCT).

Las células de túbulo proximal (MCT) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de STF de complementado, 2mM L-glutamina, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Las MCT, proceden de la corteza renal de ratones SJL (Harvey et al, 1988) y fueron cedidas por E.G. Neilson (Universidad de Pennsylvania, EEUU). Al llegar a la confluencia estas células son incubadas en medio RPMI 1640 sin suero durante 24 horas antes de realizar los experimentos.

En el diseño de los distintos experimentos en todos los tipos celulares hemos empleado diferentes péptidos recombinantes, así como oligonucleótidos antisentido e inhibidores de las vías de señalización estudiadas, que quedan recogidos en las tablas 2 y 3.

	Dosis	Casa Comercial
AngII	10 ⁻⁷ mol/L	Fluka
IL-1β	1 ng/ml	Peptotech
IL-6	10 ng/ml	Peptotech
CTGF	10 ng/ml	MBL International Corporation
TGF-β	1 ng/ml	Peptotech
TNF-α	100 ng/ml	Peptotech

Tabla 2: Relación de estímulos empleados en los experimentos *in vitro*, así como sus respectivas dosis y casas comerciales.

	Dosis	Función	Casa Comercial
SB203580	10 ⁻⁶ mol/L	Inhibidor de p38	Stressgen Bioreagents Corp.
PD98059	10 ⁻⁶ mol/L	Inhibidor de ERK1/2	Stressgen Bioreagents Corp.
SP600125	10 ⁻⁶ mol/L	Inhibidor de JNK1/2	Stressgen Bioreagents Corp.
Fasudil	10 ⁻⁶ mol/L	Inhibidor de ROCK	Tocris Cookson
Y-27632	10 ⁻⁶ mol/L	Inhibidor de ROCK	Tocris Cookson
Wortmannina	10 ⁻⁹ mol/L	Inhibidor de PI3K/Akt	Calbiochem
Inhibidor I de MMP-9	10 ⁻⁶ mol/L	Inhibidor actividad de MMP-9	Calbiochem
Parthenolide	10 ⁻⁶ mol/L	Inhibidor de NFκB	Sigma
BAY 11-7082	10 ⁻⁶ mol/L	Inhibidor de NFκB	Calbiochem
Oligonucleótido antisentido CTGF	20 µg/ml	Inhibidor CTGF endógeno	Promega Corp.

Tabla 3: Relación de los inhibidores empleados en los experimentos *in vitro*, así como sus respectivas dosis, funciones y casas comerciales.

3. EXTRACCIÓN Y MEDIDA DE LA CALIDAD-PUREZA DEL ARN.

Las muestras de riñón, congelado en nitrógeno líquido, se pulverizaron en una cámara metálica estéril. El polvo obtenido se disolvió en 1 ml de Trizol (Invitrogen). En el caso de las células, fueron recogidas de la placa en 1 ml de Trizol. Después se siguió el protocolo de extracción de ARN recomendado por el fabricante.

La cuantificación de ARN celular y tisular se determinó por la medida, en un espectrofotómetro, de la absorbancia a 260 nm. La pureza del ARN se calculó mediante la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Se consideró una pureza adecuada de ARN aquella que tuviera un valor de $Abs\ 260/280 = 1,8-2,0$ estos valores garantizan que la muestra está prácticamente libre tanto de fenol como de proteínas.

Para comprobar que el ARN no estaba degradado se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (con formaldehído) en geles de agarosa. Los geles se prepararon al 1,2% de agarosa en 100 ml de agua DEPC. Una vez enfriada la mezcla, se añadieron 10 ml de tampón MOPS 10x y 4,5 ml de formaldehído al 37%, formamida al 50% y MOPS también al 50%, y se calentaron durante 10 minutos a 50°C para su desnaturalización. Los tubos se enfriaron en hielo y se les añadieron 2 µl de tampón de carga (50% glicerol, 1 mM EDTA pH 8,0, trazas de azul de bromofenol) y 1 µl de bromuro de etidio. La integridad del ARN se confirmó por la separación electroforética, observando 2 bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S.

3.1. Northern Blot.

Muestras de 10 a 40 µg de ARN fueron desnaturalizadas en 50% formamida, 6% formaldehído, 1x MOPS y 0,5 mg/ml de bromuro de etidio durante 10 minutos a 65°C y se enfrió después rápidamente en hielo. Se añadieron 3 µl de tampón de carga (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol y 0,25% xilencianol), y se sometieron a separación electroforética en geles al 1% de agarosa-formaldehído en condiciones desnaturalizantes. Los geles fueron transferidos a membranas de nylon (Genescreen) por capilaridad en tampón fosfato 0,025 mol/L, y se fijó por luz UV. La ausencia de degradación, la posición de los ARN ribosomales 28S y 18S, así como la eficacia de la transferencia se comprobó en un transiluminador por luz UV.

Las membranas fueron prehibridadas durante al menos 4 horas a 42°C en solución de hibridación (50% formamida desionizada, 1% SDS, 5x SSC, 1x solución Denhardt, 0,025 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado y 50 mmol/L tampón fosfato sódico pH=6,5). La hibridación se realizó a 42°C toda la noche con 20% sulfato de dextrano y la sonda de ADN marcada y desnaturalizada.

Las sondas de ADN fueron obtenidas a partir de fragmentos de RT-PCR, y fueron marcadas radiactivamente con [$\alpha^{32}P$]-dCTP (Amersham) utilizando un la técnica Random Primed DNA labeling kit

(Roche Diagnostics), basada en la incorporación de nucleótidos marcados con ^{32}P al ADN desnaturalizado mediante el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E.coli. Tras esto se purificó la sonda mediante el kit comercial Wizard DNA Clean Up System de Promega. Una vez finalizada la hibridación, se procedió al lavado del exceso de sonda de las membranas en 1x SSC, 0,1% SDS durante 15 minutos a temperatura ambiente, y dos lavados con 0,1x SSC, 0,1% SDS a 55 °C durante 35 minutos. La autorradiografía se realizó según técnicas estándar y se utilizó gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y 28S como control de carga en los geles. La relación ARN vs GAPDH fue expresada como incremento de n-veces respecto al control.

3.2. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real.

Sometimos 2 µg de ARN a transcripción inversa usando oligonucleotidos aleatorios y la transcriptasa inversa modificada MMLV (Superscript II, Life technologies). La PCR a tiempo real se llevó a cabo en un sistema de detección de secuencia Taqman ABI 7500 usando una polimerasa activada por calor TaqDNA (Amplitaq Gold). Después de un paso inicial de 2 minutos mantenidos a 50°C y 10 minutos a 95°C las muestras se sometieron a 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos.

GEN	ID del ensayo o PDAR	Especie
MCP-1	Mm00441242_m1	Ratón
CCR2	Mm99999051_gh	Ratón
RANTES	Mm01302428_m1	Ratón
IL-6	Mm00446190_m1	Ratón
ICAM-1	Mm00516023_m1	Ratón
CTGF	Rn00573960_g1	Rata
Procolágeno IV	Rn01401018_m1	Rata
MMP-9	Rn00579162_m1	Rata
TIMP-1	Rn00587558_m1	Rata
Trombospondina-1	Rn01513693_m1	Rata
TGF-β	Rn00572010_m1	Rata
GAPDH	Rn99999916_s1	Rata
GAPDH	Mm99999915_g1	Ratón
18s	Hs99999901_m1	Humano

Tabla 4: Relación de los ensayos empleados para PCR a tiempo real.

Para todos los análisis cuantitativos del ADNc aplicamos la técnica del ΔCT^{30} . Utilizamos GAPDH y 18S ARNr como genes endógenos que amplificamos en paralelo a los genes de interés. Normalizamos la expresión de cada gen de interés con cada uno de los genes endógenos. Las secuencias conseguidas en los números de acceso al gene bank nos sirvieron para el diseño de los ensayos (oligos y sondas), antiguos PDAR (pre-developed Taqman assay reagents). Los ensayos o PDAR usados se describen en la tabla 4. Todos los oligos y sondas fueron adquiridos a Applied Biosystems. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Usamos controles con H₂Odd que analizamos como negativo en todos los casos.

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF κ B: ENSAYO DE EMSA.

4.1. Extracción de Proteínas nucleares de Tejido.

La extracción de proteínas nucleares se realizó mediante un método descrito previamente²⁰¹. Para la extracción de proteínas nucleares de tejido, se pulveriza parte del tejido en una cámara metálica y se resuspende en tampón de extracción frío (20 mmol/L HEPES-NaOH a pH=7,6; 20% v/v glicerol; 0,35 mol/L NaCl; 5 mmol/L MgCl₂; 0,1 mmol/L EDTA; 1 mmol/L DTT; 0,5 mmol/L PMSF). Las muestras permanecieron en hielo durante 30 minutos, agitándolas vigorosamente cada 5 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C para retirar los materiales insolubles. Tras la centrifugación se aislaron los sobrenadantes y se dializaron durante toda la noche a 4°C en tampón B (50 mmol/L HEPES pH=7,8; 50 mmol/L KCl; 10% glicerol; 1 mmol/L PMSF; 1 mmol/L DTT y 0,1 mmol/L EDTA). La concentración proteica de las muestras se determinó empleando el método de BCA (Pierce Chemical Co), y las muestras se almacenaron a 80°C bajo cero hasta su uso.

4.2. Extracción de Proteínas nucleares de células en cultivo.

Extractos nucleares y citosólicos fueron aislados por homogenización, centrifugación y diálisis²⁰⁴. Tras el experimento las células fueron lavadas con salino frío y resuspendidas en tampón A (10 mmol/L HEPES pH=7,8; 15 mmol/L KCl; 2 mmol/L MgCl₂; 1mmol/L EDTA; 1 mmol/L DTT; 1 mmol/L PMSF). Las células se mantuvieron en hielo durante 10 minutos, fueron centrifugadas, y resuspendidas en 100 μ l de tampón A. Mediante centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos se separó la fracción citosólica de la nuclear. El precipitado que contiene los núcleos se resuspendió nuevamente en tampón A. Se añadió KCl 3 mol/L hasta una molaridad final de 0,39 mol/L, se incubaron durante 45 minutos a 4°C y se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 minutos también a 4°C. Los sobrenadantes, con los extractos nucleares, fueron dializados en tampón B toda la noche a 4°C (50 mmol/L HEPES pH=7,8; 50 mmol/L KCl; 10% glicerol; 1mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT y 0,1 mmol/L EDTA). Las muestras se almacenaron a 80°C bajo cero hasta su uso. La concentración de proteína de las fracciones citosólica y nuclear fueron determinadas por el método del BCA.

4.3. Ensayo de Actividad de Unión al ADN.

La actividad de unión al ADN de NF κ B fue evaluada usando 50 μ g de extracto proteico tisular y 10 μ g de extracto proteico nuclear de las células, con el oligonucleotido consenso de NF κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') (Promega) marcado radiativamente mediante incubación a 37°C durante 30 minutos con 10U de T₄ polinucleotido quinasa (Promega), 10 μ Ci de [γ -³²P]-ATP, 70 mmol/L de Tris-HCl; 10 mmol/L MgCl₂ y 5 mmol/L DTT. Finalmente la reacción se detuvo con EDTA hasta una concentración final de 0,05 mol/L y se llevó hasta un volumen final de 100 μ l con tampón TE.

Para establecer la especificidad de la reacción, se incluyeron controles negativos sin extractos nucleares y ensayos de competición con un exceso (100 veces) del oligonucleotido NF κ B sin marcar, un oligonucleotido NF κ B mutante y un oligonucleotido inespecífico AP-1. Los complejos formados se analizaron mediante ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA), los complejos proteína-ADN fueron separados del exceso de sonda no unida en un gel no desnaturante de poliacrilamida al 4%, en 0.25% TBE a 150 v durante 2 horas a temperatura ambiente. Después los geles fueron deshidratados a 80°C durante 2 horas, y se expusieron las autorradiografías, que fueron analizadas en un densitómetro.

5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA DE METALOPROTEASAS: ZIMOGRFÍA.

El ensayo de la actividad gelatinolítica de las Metaloproteasas se realizó en el medio de cultivo condicionados. Los sobrenadantes celulares se analizaron por electroforesis en geles SDS-PAGE al 7,5% que contiene 1mg/mL de gelatina (Sigma) en condiciones no reductoras⁵⁴. Los geles se incubaron durante 30 minutos en buffer renaturalizante a temperatura ambiente (25% Triton X-100). Después los geles fueron incubados durante otros 30 minutos también a temperatura ambiente con 50mM Tris-HCl, 0,2M NaCl, 5 Mm CaCl₂, 0,02% Brij 35. Pasado este tiempo se renovó el buffer y los geles se incubaron durante 18 horas a 37°C. Para revelar las zonas de degradación de las proteínas gelatinolíticas, los geles se tiñeron con Azul Coomassie (diluido en 50:10:40 de metanol:ácido acético:agua) durante toda la noche y después se mantuvieron durante unas 6 horas en una solución que contiene 20% de metanol y 10% de ácido acético.

El medio condicionado celular obtenido tras realizar el experimento contiene varias gelatinasas como MMP-2 y MMP-9, caracterizadas por propiedades migratorias diferentes en el gel mostrando bandas líticas en diferente peso molecular, 70 KDa y 92 KDa respectivamente⁵⁵. Para excluir la posibilidad de que las variaciones observadas en las bandas líticas fueran debidas a diferencias en el número de células sembradas en cada placa, de forma rutinaria se determinó el número total de células en cada una de las condiciones experimentales, así como la concentración de proteínas totales soluble en el medio analizado. Además las propiedades de migración de las proteínas se determinó

comparando con un marcador de amplio rango de pesos moleculares. La cuantificación de obtuvo mediante análisis densitométrico de las bandas líticas observadas.

6. DETERMINACIÓN DE NIVELES PROTEICOS.

6.1. Análisis de Western Blot.

Las proteínas de tejido se extrajeron empleando un tampón de lisis que contiene: 50 mmol/L Tris-HCl; 150 mmol/L NaCl; 2 mmol/L EDTA; 2 mmol/L EGTA; 25 mmol/L NaF; 0,2% Triton X-100; 0,3% NP-40; 1 mmol/L PMSF y 1 µl/ml coctel de inhibidores de proteasas. Tras realizar el experimentos las células se lavaron con salino frío y se recogieron con tampón de lisis (2,5% SDS; 25% glicerol; 200 mmol/L Tris-HCl pH=6,8; 1 mmol/L PMSF y 10 µl/ml cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma)). Por su parte, las proteínas solubles se analizaron directamente de los sobrenadantes. La concentración de proteínas en ambos casos se determinó mediante el método de BCA. Los lisados totales, los extractos citosólicos y nucleares (obtenidos como se describió anteriormente), y el medio condicionado con las proteínas solubles se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS a distintos porcentajes, en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore Co.). Las membranas se bloquearon para evitar uniones inespecíficas en tampón TBS con 0,1% de Tween 20 y 7,5% de leche durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 5) diluidos en TBS con 0,1% de Tween 20 y 5% de leche durante toda la noche a 4°C.

	ANTICUERPO PRIMARIO (Dilución)	ANTICUERPO SECUNDARIO (Dilución)	CASA COMERCIAL
CTGF	1:5000	Anti-conejo peroxidasa	Torrey Pines Biolabs Inc.
Fibronectina	1:2500	Anti-ratón peroxidasa	Chemicon Int.
Colágeno IV	1:2500	Anti-conejo peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies
IκBα	1:2500	Anti-conejo peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies
α-Tubulina	1:10000	Anti-ratón peroxidasa	Sigma
ERK1/2 fosforilado	1:2000	Anti-ratón peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies
ERK1/2	1:2500	Anti-conejo peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies
JNK1/2 fosforilado	1:2000	Anti-ratón peroxidasa	Stressgen Bioreagents
JNK1/2	1:2000	Anti-conejo peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies
p38 fosforilado	1:500	Anti-ratón peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies
p38	1:1000	Anti-conejo peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies
Akt fosforilado	1:1000	Anti-conejo peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies
Akt	1:2500	Anti-conejo peroxidasa	Santa Cruz Biotechnologies

Tabla 5: Relación de anticuerpos empleados, las dosis utilizadas, los anticuerpos secundarios correspondientes y las casas comerciales.

Tras sucesivos lavados en TBS con 0,1% de Tween 20, se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo se realizan sucesivos lavados para retirar el exceso de anticuerpo no unido. Las bandas se detectaron mediante el Kit quimioluminiscente ECL y la exposición se cuantificó mediante análisis densitométrico.

Como control de carga en todos los experimentos de western blot se determinaron los niveles de α -tubulina y se realizó tinción con Rojo Ponceau para verificar la eficacia de la transferencia.

6.2. Ensayo de ELISA.

La liberación de colágeno IV al medio extracelular fue evaluado por ELISA (Exocell INC.) según las recomendaciones de los fabricantes.

Se determinaron los niveles de producción de las citoquinas IL-10, IL-6, IL-4 e IFN- γ mediante ELISA (BD Bioscience) en los extractos de proteína total de los riñones de los animales del modelo de administración sistémica de CTGF, a partir de los homogeneizados de proteína total obtenidas mediante la pulverización del tejido en cámara metálica y su resuspensión en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 2mM; EGTA 2 mM; Triton X-100 0,2%; IGEPAL 0,3%; Cocktail de Inhibidores 10 μ l/mL; PMSF 10 μ l/mL y Ortovanadato 10 μ l/mL).

6.3. Ensayo de Inmunofluorescencia.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubres de cristal. A continuación las células se incubaron con los inhibidores de las diferentes rutas estudiadas en cada caso durante 1 hora y después se añadieron los estímulos correspondientes incubando las células durante distintos tiempos: 24, 48 y 72 horas para la detección de colágeno IV, y durante 15, 30 y 60 minutos para la detección de las subunidades de NF κ B (p50, p65 y p52). Tras realizar el experimento, se lavaron con salino y se fijaron con Merckofix (Merck) y se trataron con 0,1% Triton X-100 durante 1 minuto en hielo. Después se bloquearon con 4% BSA en PBS 1x durante 1 hora en agitación y después se incubó en agitación durante toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios: p50, p65, p52, colágeno IV (1/50; Santa Cruz Biotechnologies). Tras lavarlas con PBS 1x se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (1/200) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Después las células se incubaron con yoduro de propidio y RNasas con el propósito de diferenciar los núcleos celulares en su visualización con el microscopio confocal (Leika). Como control negativo usamos la ausencia de anticuerpo primario (no mostrado). Las muestras fueron montadas con Mowiol 40-88 (Sigma).

7. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS Y ENSAYO DE ACTIVIDAD LUCIFERASA.

Para estudiar la transcripción génica dependiente de NF κ B las células MCT fueron sembradas en placas de 6 pocillos, y tras 24 horas fueron transfectadas con FUGENE (Roche Molecular Biochemicals) conteniendo 1 μ g de plásmido que contiene el promotor de NF κ B acoplado a luciferasa

(NF κ B/luc) y 1 μ g de TK-renilla como control interno (Clontech). Después de 24 horas de quiescencia las células fueron estimuladas durante otras 24 horas y la actividad luciferasa/renilla fue medida en el luminómetro Sirius (Berthold Detection Systems).

8. ESTUDIOS CON OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO DE CTGF.

Los oligonucleótidos empleados fueron, oligonucleótidos antisentido de CTGF construido por 16 bases derivadas del sitio de inicio de la transcripción, contiene el sitio de inicio G y su secuencia es: 5'-TACTGGCGGCGGTCAT-3', fue utilizado para bloquear el CTGF y el oligonucleótido sentido de CTGF 5'-ATGACCGCCGCCAGTA-3' que se empleó como control²²¹. Ambos fueron sintetizados comercialmente por Metabion Internacional (Alemania). Las células fueron preincubadas durante 30 minutos con los oligonucleótidos añadidos directamente al medio a una concentración de 20 μ g/ml.

9. MORFOLOGIA E INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las secciones de tejido renal fueron incluidas en parafina, cortadas en láminas de 4 μ m y montadas en cristales de poly-L-lisina. El tejido se desparafinó con xilol (Panreac Química SAU) y se hidrató mediante un gradiente decreciente de etanol. La morfología de los riñones se evaluó por tinción con Masson y microscopía óptica.

Para cuantificar las lesiones renales se examinó todo el intersticio de cada animal por separado evaluando los conductos proximales y distales así como los glomérulos. Se definió el daño tubular como tal cuando se observa desorganización epitelial, aumento del lumen, vacuolización, descamaciones, necrosis y pérdida de la estructura del borde en cepillo en los túmulos proximales. El daño glomerular se define como aumento en la expansión de la matriz mesangial y daño intersticial cuando hay presencia de fibrosis. Aunque la presencia de células inflamatorias se puede observar gracias a la tinción de Masson, hemos realizado inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para células T y macrófagos.

9.1. Ensayo de Inmunohistoquímica.

Para los distintos estudios, las muestras se desparafinaron, se rehidrataron, y se eliminó la peroxidasa endógena incubándolas durante 30 minutos a temperatura ambiente con 3% H₂O₂ / metanol (1:1). En los casos en los que fue necesario las secciones se trataron con tripsina 0,01% durante 30 minutos a 37°C. Después de lavar con PBS 1x se bloquearon las muestras con BSA/PBS1x y el suero correspondiente, para evitar uniones inespecíficas, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con los anticuerpos primarios (Tabla 6) durante toda la noche a 4°C. Después de lavarse con PBS 1x las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con biotina en cuyo caso se incubaron 30 minutos a 37°C con el complejo AB (Dako), o bien se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. En ambos casos, se procedió al revelado con 0,05% de 3,3'-diaminobenzidina (Dako). Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer y se montaron con DPX (EMS). Para

descartar tinciones no específicas se realizó un control negativo de cada muestra omitiendo el anticuerpo primario o usando un anticuerpo no relacionado.

DIGESTIÓN	BLOQUEO	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
Tripsina 0,01% 30 minutos 37°C	PBS 1x + 4% BSA + 6% Suero de Oveja 1 hora T° Ambiente	MCP-1 (Becton Dickinson) 1/100 en PBS1x/BSA 4%	Anti-rata biotinilado (Amersham) 1/200+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente
Tripsina 0,01% 30 minutos 37°C	PBS 1x + 4% BSA + 8% suero de Caballo 1 h 25°C • Avidina 15 min • Biotina 15 min	RANTES (Chemicon Int.) 1/50 en PBS1x/BSA 4%+1% Horse	Anti-conejo biotinilado (Amersham) 1/200+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente
Tripsina 0,01% 1 hora 37°C	PBS 1x + 4% BSA + 6% Suero de Oveja 1 hora T° Ambiente	CD3 (Serotec) 1/150 en PBS1x/BSA 4%+1% suero de Oveja	Anti-ratón biotinilado (Amersham) 1/250+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente
Tripsina 0,01% 1 hora 37°C	PBS 1x + 4% BSA + 8% Suero de Oveja 1 hora T° Ambiente	CD68 (Serotec) 1/150 en PBS1x/BSA 4%+1% suero de oveja	Anti-ratón biotinilado (Amersham) 1/250+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente
Tripsina 0,01% 30 minutos 37°C	PBS 1x + 4% BSA + 6% Suero de Caballo 1 hora 37°C	CTGF (Torrey Pines) 1/500 en PBS1x/BSA 4%+1% suero de caballo	Anti-conejo conjugado con Peroxidasa (Amersham) 1/200+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente
Sin Digestión	PBS 1x + 4% BSA + 6% Suero de Oveja 1 hora 37°C	FIBRONECTINA (Chemicon Int) 1/100 en PBS1x/BSA 4%+1% suero de oveja	Anti-ratón conjugado con Peroxidasa (Amersham) 1/200+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente
Tripsina 0,01% 30 minutos 37°C	PBS 1x + 4% BSA + 6% Suero de Caballo 1 hora 37°C	IL-1 β (Santa Cruz) 1/200 en PBS 1x + 4% BSA	Anti-conejo biotinilado (Amersham) 1/100+PBS1x/BSA 4% 1 hora 37°C
Sin Digestión	PBS 1x + 4% BSA + 6% Suero de Caballo 1 hora 37°C	TNF- α (Santa Cruz) 1/500 en PBS1x/BSA 4%+1% suero de caballo	Anti-conejo conjugado con Peroxidasa (Amersham) 1/200+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente
Sin Digestión	PBS 1x + 4% BSA + 6% Suero de Caballo 1 hora 37°C	IL-6 (Santa Cruz) 1/500 en PBS1x/BSA 4%+1% suero de caballo	Anti-conejo conjugado con Peroxidasa (Amersham) 1/200+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente
Sin Digestión	PBS 1x + 6% BSA 1 hora 37°C	TGF- β (ABCam) 1/100 en PBS1x/BSA 2%	Anti-ratón biotinilado (Amersham) 1/200+PBS1x/BSA 2% 1 hora T° Ambiente
Tripsina 0,01% 30 minutos 37°C	PBS 1x + 4% BSA + 8% Suero de cerdo 1 hora 37°C	CD43 (Becton Dickinson) 1/100 en PBS1x/BSA 2%+1% suero de cerdo	Anti-ratón conjugado con Peroxidasa (Amersham) 1/200+PBS1x/BSA 4% 1 hora T° Ambiente

Tabla 6: Condiciones y anticuerpos utilizados para los estudios por inmunohistoquímica.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las películas de autorradiografía se escanearon usando un densitometro calibrado GS-800 (Quantity One, Bio-Rad, Spain). Los resultados de los análisis de niveles de proteína y ARN se expresaron como incrementos de n-veces respecto al control como media \pm error estándar de la media (EEM). La cuantificación de las inmunohistoquímicas para determinar el infiltrado inflamatorio (CD68 y CD3) fue realizada con el Software Image Pro-Plus, y se muestra como la relación entre el área teñida para cada marcador respecto del área total evaluada en cada muestra, representada como la media \pm EEM de los datos obtenidos en tres mediciones independientes para cada animales de cada grupo. Los resultados de las tinciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se muestran como resultado representativo de varios experimentos.

Para calcular la igualdad de varianza entre los grupos se utilizó el test de Levene. Aquellas variables continuas que presentaban igualdad de la varianza y una distribución normal, se analizaron mediante test paramétricos (ANOVA). Cuando se encontraron diferencias significativas se realizó un test de Bonferroni post-hoc que fue usado para identificar diferencias entre grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software estadístico SPSS versión 11.0.

Resultados

PARTE I: ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE CTGF *IN VIVO*: CORRELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL.

1. Estudios *in vivo* en el modelo experimental de daño renal por infusión sistémica de Angiotensina II.

En la patología renal experimental y humana se ha descrito un aumento en la expresión renal de CTGF, asociado a la fibrosis^{82,259,263}. Nuestro primer objetivo ha sido evaluar la regulación de la expresión renal de CTGF en las distintas etapas del daño renal. Para ello hemos realizado un modelo de daño renal inducido por infusión sistémica de AngII en ratas Wistar Kyoto durante 3 días, 1 y 2 semanas. En estos animales hemos evaluado las lesiones renales, la presencia de células inflamatorias y la acumulación de matriz extracelular, así como la inducción de factores proinflamatorios y profibróticos.

En primer lugar, mediante inmunohistoquímica, hemos evaluado la presencia de células inflamatorias en el riñón. Tras 3 días de infusión con AngII, hemos detectado la presencia de células inflamatorias infiltrantes en las áreas tubulointersticiales y en el glomérulo (tinción CD43 positiva: células T, macrófagos y granulocitos), indicando un proceso inflamatorio en el riñón de estos animales (Figura 14).

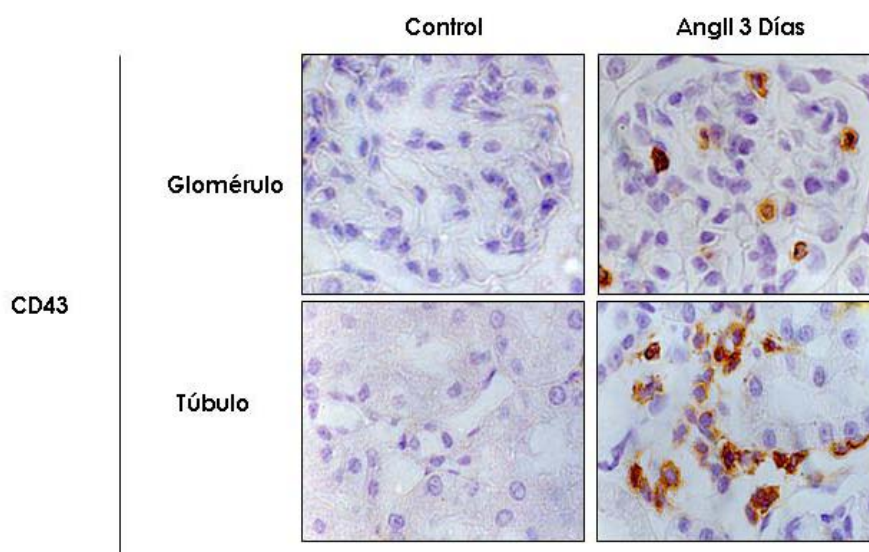


Figura 14: La infusión sistémica de AngII en ratas induce el infiltrado de células inflamatorias. Las ratas fueron infundidas con AngII (50 ng/kg/min n=8) durante 3 días. La presencia de macrófagos se detectó mediante inmunohistoquímica en cortes de riñón en parafina empleando un anticuerpo para CD43. La figura muestra la localización de células inflamatorias (macrófagos, granulocitos y linfocitos T) en el glomérulo y en regiones tubulointersticiales en el riñón de animales infundidos con AngII (mostrando 1 animal representativo de cada grupo). 100x.

Hemos evaluado la producción de citoquinas inflamatorias clásicas como IL-1 β , IL-6, TNF- α y el factor quimiotáctico MCP-1 (principal molécula encargada del reclutamiento de macrófagos), todos ellos implicados en el progreso de la respuesta inflamatoria (Figura 15). Las ratas infundidas con AngII durante 3 días mostraron un aumento muy marcado en la producción de IL-6, TNF- α y MCP-1 en los túbulos y el glomérulo. Por su parte, IL-1 β no aumentó en respuesta a la infusión con AngII, indicando que esta citoquina no está regulada por AngII, sugiriendo que IL-1 β podría actuar como modulador o molécula cooperadora en las acciones de AngII.

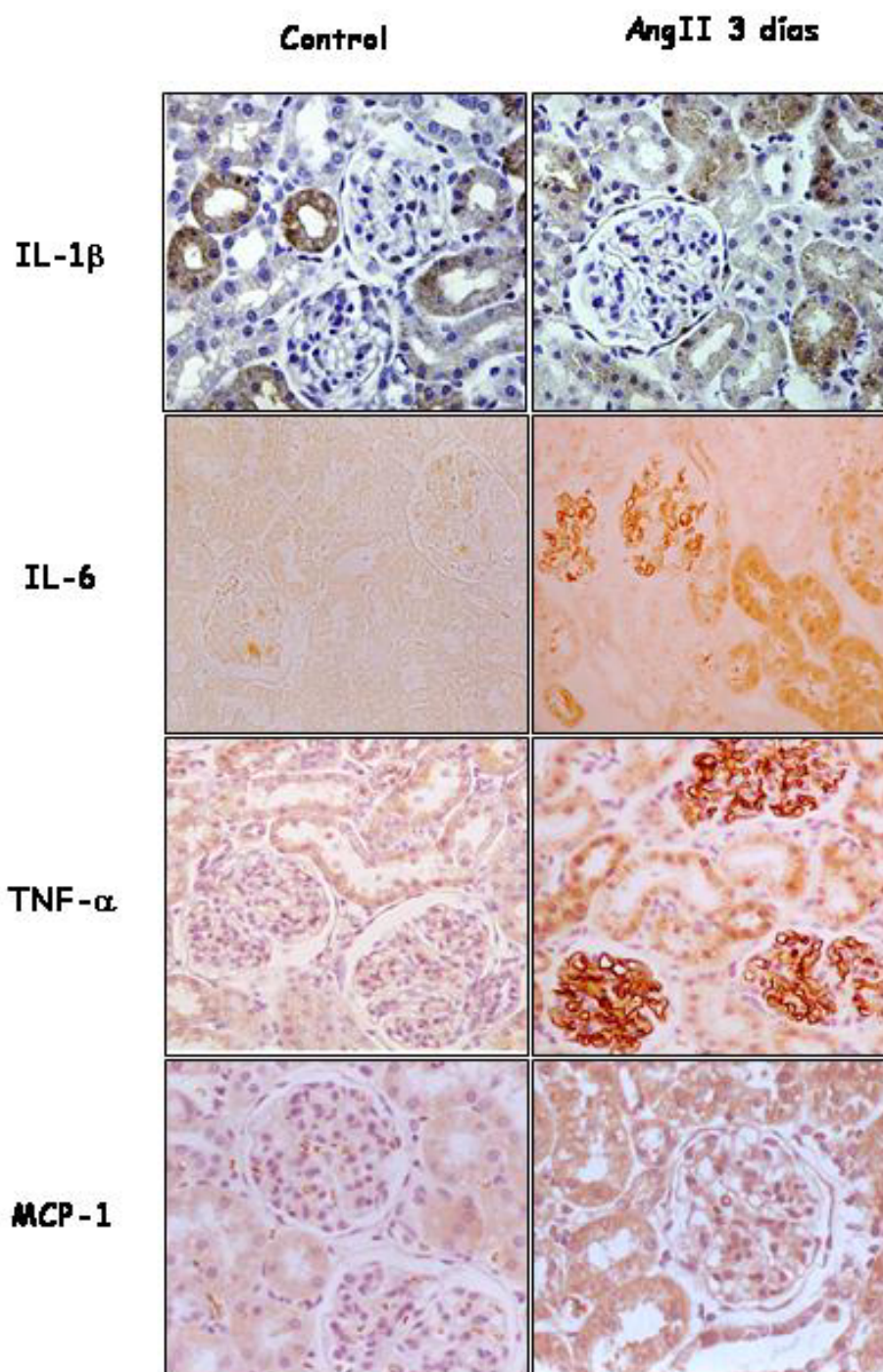


Figura 15: La infusión sistémica de AngII en ratas incrementa la síntesis renal de IL-6, TNF- α y MCP-1, pero no de IL-1 β . Las ratas fueron infundidas con AngII (50 ng/kg/min n=8) durante 3 días. La producción de proteína se observó por inmunohistoquímica en cortes de riñón incluidos en parafina. La figura muestra la localización de IL-1 β , IL-6, TNF- α y MCP-1 en el riñón mostrando 1 animal representativo de cada grupo. 40x.

Durante el daño renal, el aumento de citoquinas inflamatorias lleva a la activación de fibroblastos renales y demás células residentes que potencian la producción de proteínas de matriz extracelular de forma exagerada y su acumulación en zonas intersticiales dando lugar a la fibrosis^{46,48,103,175,197,234,249}. En ratas infundidas con AngII durante 3 días, los niveles de expresión génica del factor profibrótico CTGF están aumentados respecto a los encontrados en los animales controles (Figura 16A). Al cabo de dos semanas de infusión, estos niveles de expresión permanecen elevados. Para evaluar la producción de proteína, hemos realizado inmunotinción para CTGF, observando que a

los 3 días de infusión de AngII, los animales muestran una marcada tinción para CTGF en células mesangiales y tubulointersticiales, que permanece aumentada tras dos semanas de infusión (Figura 16B).

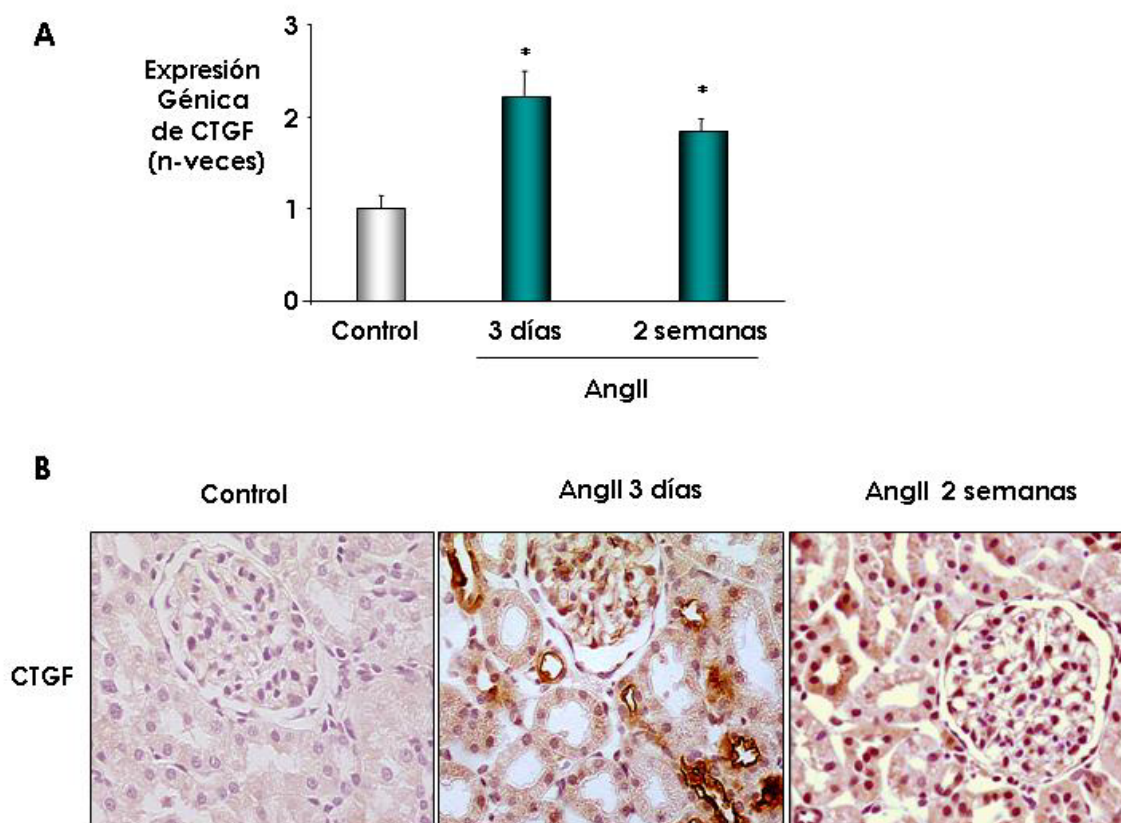


Figura 16: La infusión sistémica de AngII en ratas incrementa la expresión y producción renal de CTGF. Las ratas fueron infundidas con AngII (50 ng/kg/min n=8) durante 3 días y 2 semanas. El ARN fue extraído y analizado por PCR a tiempo real, y la producción de proteína por inmunohistoquímica en cortes de riñón en parafina. La figura **(A)** muestra la expresión génica de CTGF expresada como media±EEM de cuatro a ocho animales por grupo; como control interno se utilizó GAPDH y 18S. En la figura **(B)** se muestra, la localización de CTGF por inmunohistoquímica mostrando 1 animal representativo de cada grupo. * $p < 0.05$ vs control. 40x.

Además, hemos observado que tras 1 semana de infusión aparece un aumento en la acumulación de fibronectina en áreas tubulointersticiales, indicando el inicio del proceso fibrótico (Figura 17). El aumento en la producción de CTGF precede en el tiempo a la acumulación de fibronectina, apoyando la hipótesis que sugiere que CTGF podría ser un mediador de la fibrosis inducida por AngII.

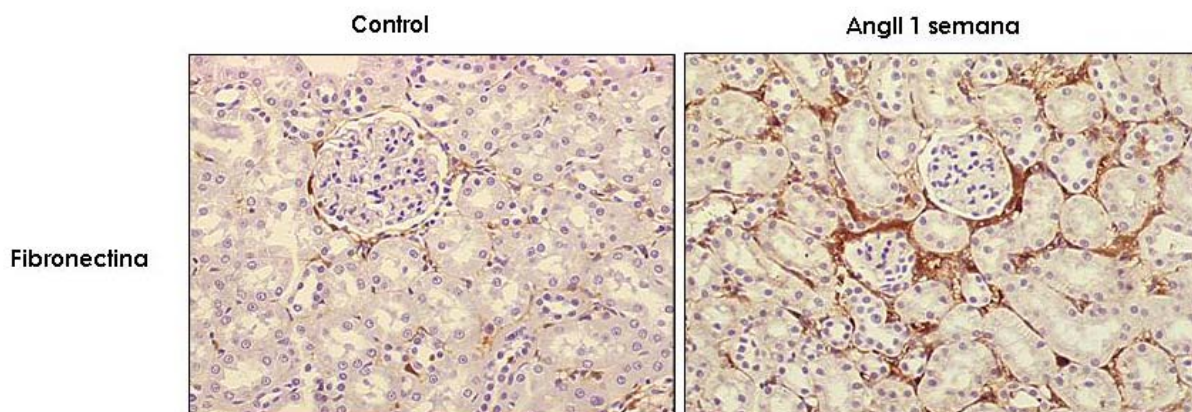


Figura 17: La infusión sistémica de AngII en ratas durante 1 semana incrementa la producción renal de fibronectina. Las ratas fueron infundidas con AngII (50 ng/kg/min n=8) durante 1 semana. La producción de proteína fue evaluada por inmunohistoquímica en cortes de riñón en parafina. La figura muestra la localización intersticial de fibronectina mostrando 1 animal representativo de cada grupo. 20x.

Otro de los factores precursores de la fibrosis renal es TGF- β ^{21,67,216}. La expresión génica de TGF- β aumenta a los 3 días de infusión con AngII, y permanece elevada hasta las 2 semanas (Figura 18A). En los animales infundidos durante 3 días, no se observó aumento en la expresión de trombospodina-1 (datos no mostrados), proteína implicada en la activación de TGF- β ¹⁵⁶. Sin embargo, mediante inmunohistoquímica y western blot hemos observado que la producción proteica de TGF- β no aumenta hasta pasadas dos semanas de infusión con AngII (Figura 18B y 18C).

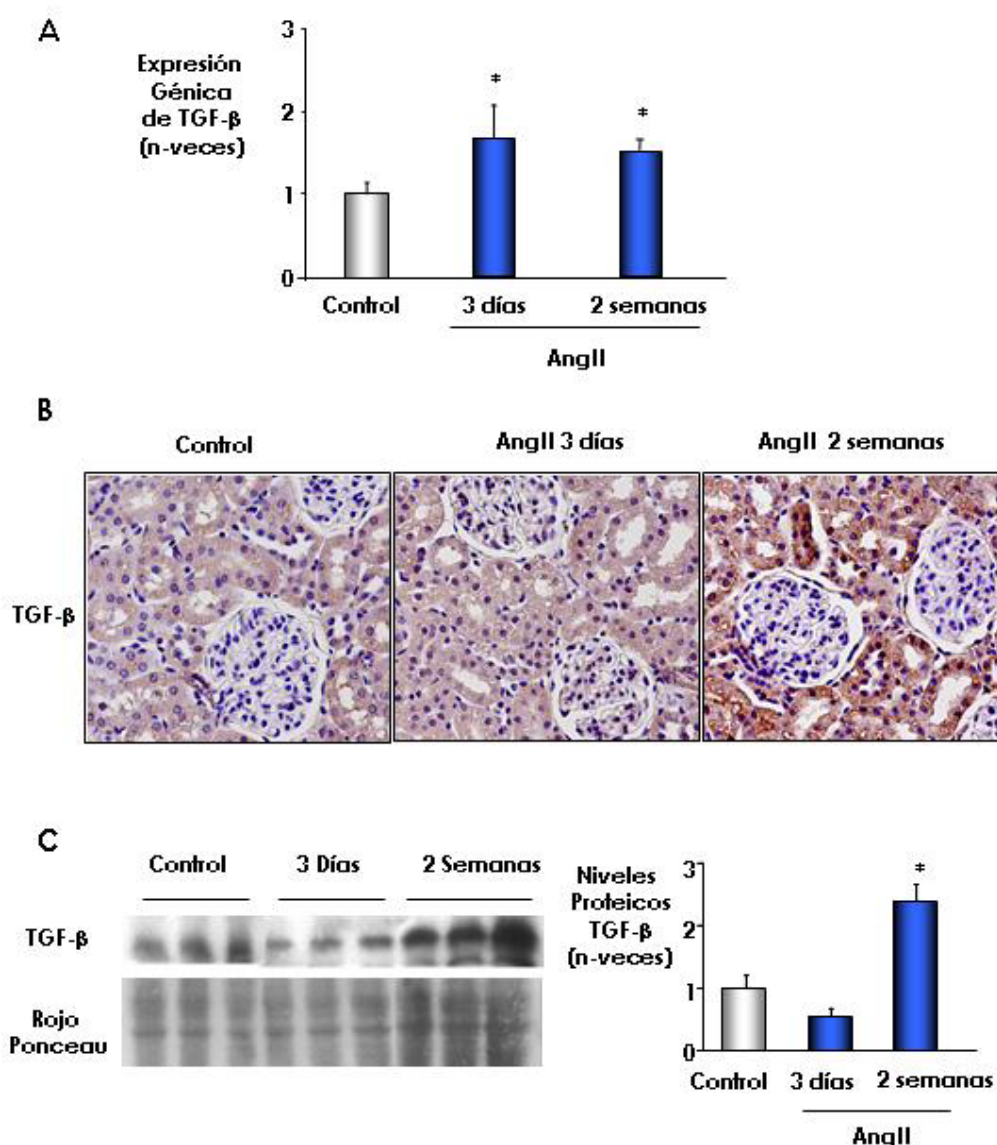


Figura 18: La infusión sistémica de AngII en ratas incrementa la expresión y producción renal de TGF- β . Las ratas fueron infundidas con AngII (50 ng/kg/min n=8) durante 3 días y 2 semanas. El ARN fue extraído y analizado por PCR a tiempo real, y la producción de proteína por inmunohistoquímica en cortes de riñón en parafina y western blot. La figura (A) muestra la expresión génica de TGF- β expresada como media \pm EEM de cuatro a ocho animales por grupo. En la figura (B) se muestra la localización renal de TGF- β por inmunohistoquímica mostrando 1 animal representativo de cada grupo. En la figura (C) se muestra a la izquierda un gel de western blot para TGF- β representativo y a la derecha los niveles de proteína de TGF- β expresados como de media \pm EEM de cuatro a ocho animales por grupo. * p<0,05 vs Control.

Estos datos sugieren que la síntesis de CTGF causada por la AngII es independiente de TGF- β , al menos a los 3 días de tratamiento. Además estos datos nos indican que la respuesta fibrótica causada por AngII en el riñón puede ser mediada en gran parte por CTGF.

La presencia de TGF- β en el riñón esta relacionada con el proceso de transdiferenciación tubuloepitelial²⁹. Por PCR a tiempo real, hemos analizado la expresión renal del marcador mesenquimal α -actina de músculo liso (α -SMA: característico de miofibroblastos) a diferentes tiempos, observando

que solo aumentó su expresión génica en los animales infundidos durante 2 semanas con AngII respecto a los controles (Figura 19). En estos animales la expresión génica de vimentina no fue modificada, pero el marcador epitelial E-cadherina (componente esencial de la membrana epitelial) disminuyó (Figura 19). Estos datos indican la inducción del proceso de la TEM a las dos semanas de tratamiento con AngII.

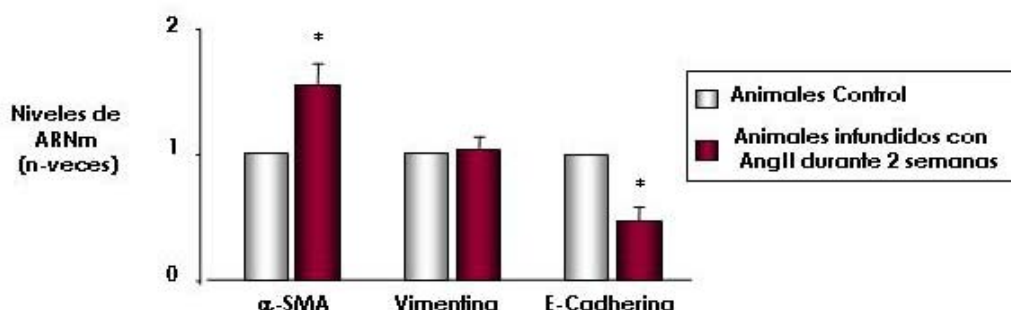


Figura 19: La infusión de AngII en ratas durante 2 semanas induce la expresión renal del marcador mesenquimal α -SMA y reduce el marcador epitelial E-cadherina. La figura muestra la expresión génica de los marcadores de la TEM α -SMA, vimentina y E-cadherina analizada por PCR a tiempo real y expresada como la media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p < 0.05$ vs control.

Estos resultados nos indican que durante el daño renal, se produce el aumento de diversos factores inflamatorios incluídas citoquinas (como IL-6 y TNF- α) y quimioquinas (MCP-1) que participan en el proceso inflamatorio, al regular el reclutamiento de células inflamatorias y contribuir a la progresión del daño. El aumento de CTGF a los 3 días de tratamiento con AngII, coincide en el tiempo con la respuesta inflamatoria y precede a la acumulación de fibronectina que se observa a la semana de infusión. CTGF se mantiene elevado a las 2 semanas, tiempo en que TGF- β se observa también aumentado y se inicia el proceso de la TEM (Figura 20).

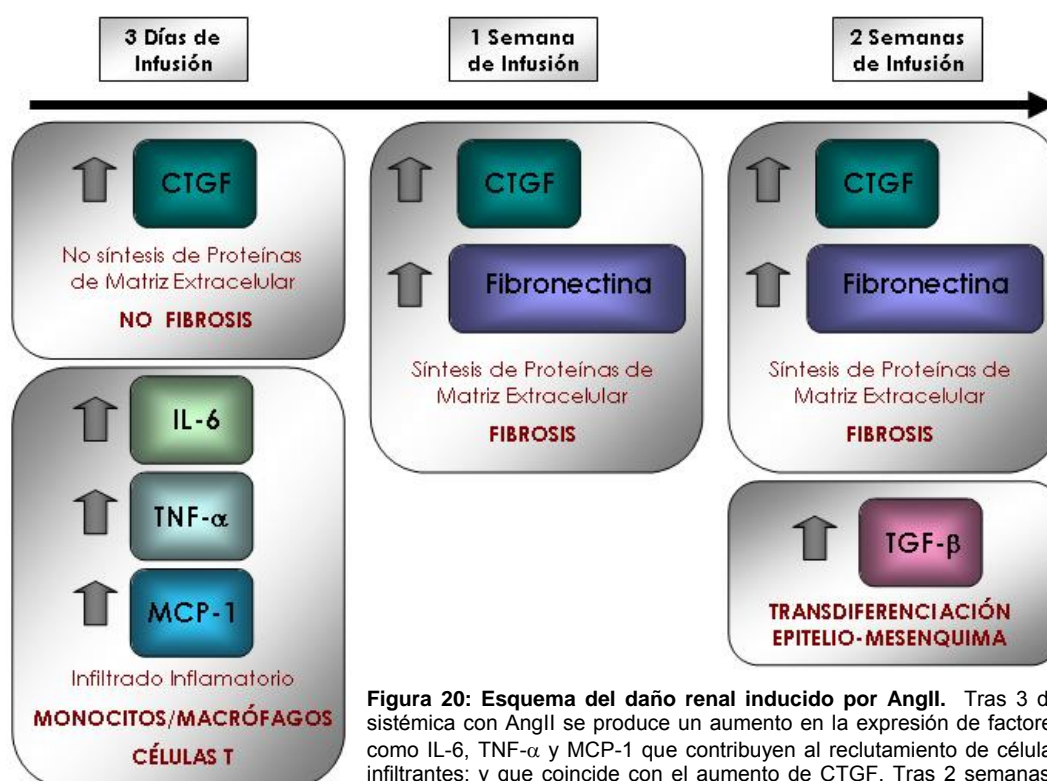


Figura 20: Esquema del daño renal inducido por AngII. Tras 3 días de infusión sistémica con AngII se produce un aumento en la expresión de factores inflamatorios como IL-6, TNF- α y MCP-1 que contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias infiltrantes; y que coincide con el aumento de CTGF. Tras 2 semanas se produce el aumento de TGF- β , el cual contribuye a la acumulación de proteínas de matriz y al inicio del proceso de la TEM.

PARTE II: CTGF ES UN MEDIADOR DE LA FIBROSIS RENAL.

1. CTGF participa en la producción de fibronectina y colágeno IV causada por AngII en CM.

Nuestros datos *in vivo*, sugieren que CTGF podría ser un mediador de la fibrosis renal causada por AngII. Mediante estudios *in vitro* en células mesangiales de rata hemos evaluado si CTGF regula la producción de matriz extracelular (fibronectina y colágeno IV) utilizando para ello oligonucleotidos (ODN) antisentido de CTGF que bloquean su producción endógena.

Las CM fueron incubadas con los ODN antisentido de CTGF (20 µg/ml), 30 minutos antes de estimularlas con AngII (10⁻⁷ mol/L). En estas células, AngII indujo la liberación al medio extracelular de fibronectina después de 48 y 72 horas de incubación. La incubación con el ODN antisentido de CTGF bloqueó la producción de fibronectina mediada por AngII hasta niveles controles (Figura 21).

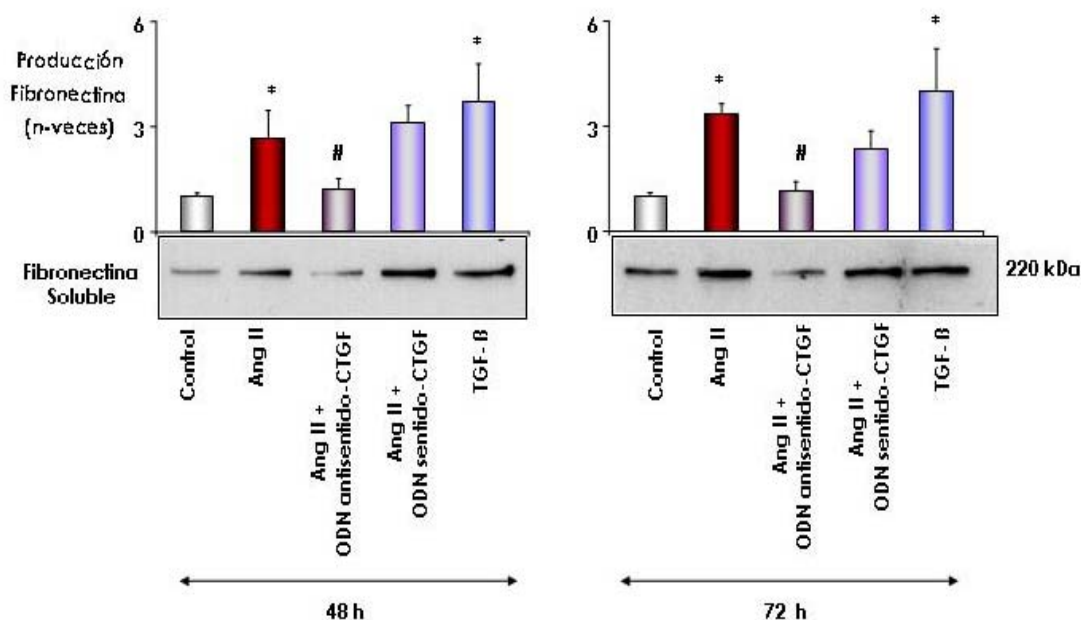


Figura 21: CTGF está implicado en la producción de Fibronectina por AngII. Las CM fueron tratadas con 10⁻⁷ mol/L AngII durante 48 y 72 horas y la producción de fibronectina soluble fue analizada por western blot. Para neutralizar las acciones de CTGF, las células fueron co-tratadas con 20 µg/ml de ODN antisentido de CTGF; como control negativo empleamos ODN sentido de CTGF y como control positivo de la producción de fibronectina utilizamos TGF-β (1 ng/ml). La figura representa la cuantificación de los niveles de fibronectina como media ± EEM y un gel de western blot representativo de cinco experimentos realizados. * p<0,05 vs control. # p<0,05 vs AngII.

Por su parte, el colágeno IV se expresa en condiciones fisiológicas en células glomerulares y tubulares, pero en situaciones patológicas se produce una síntesis exagerada junto con otros componentes de matriz extracelular, que lleva a su acumulación en regiones intersticiales¹²².

Los siguientes experimentos fueron diseñados para evaluar si CTGF actúa como mediador de la síntesis de colágeno IV en CM. Tratamos a las células con proteína CTGF (10 ng/ml) y AngII (10⁻⁷ mol/L) durante 24, 48 y 72 horas. Mediante inmunofluorescencia estudiamos la presencia de colágeno IV en

CM. Observamos que CTGF aumentó la producción de colágeno IV (a las 24 horas siendo el incremento máximo a las 72 horas), de forma similar a lo observado con AngII (Figura 22). El bloqueo de CTGF endógeno por un ODN antisentido para CTGF, redujo la expresión de ARNm de procolágeno IV y la producción de proteína inducida por AngII (Figura 22).

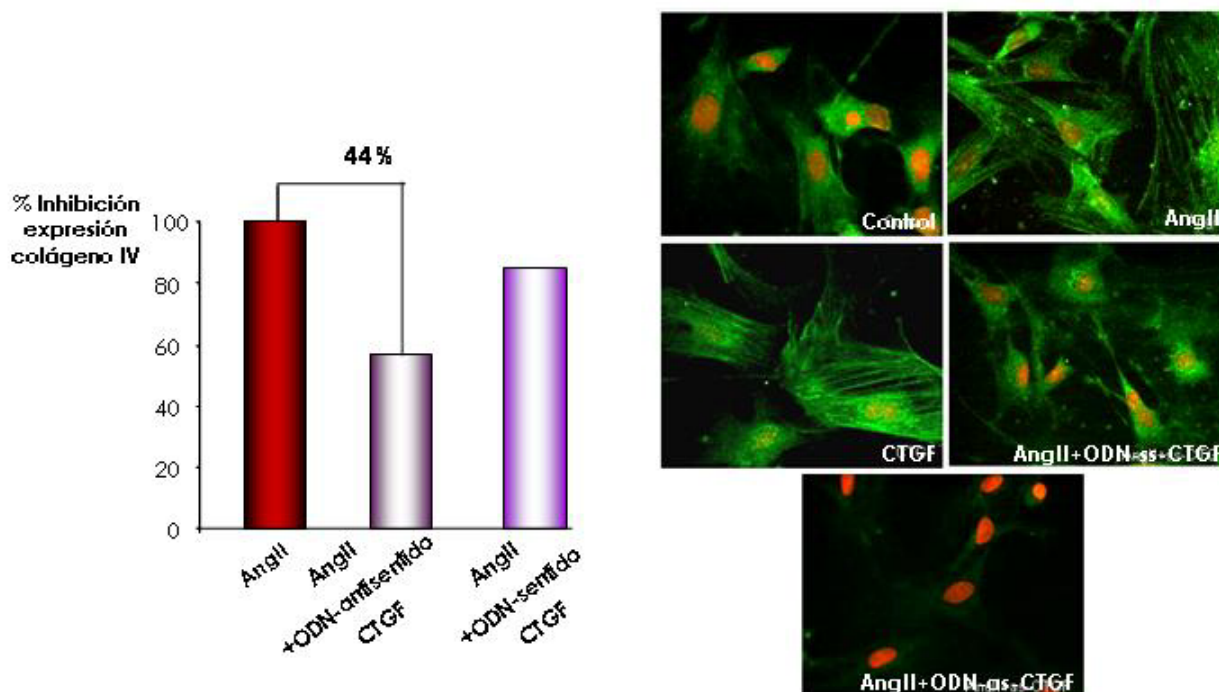


Figura 22: Papel de CTGF en la regulación de colágeno IV inducido por AngII. Las células fueron privadas de suero durante 48 horas y estimuladas con 10^{-7} mol/L AngII y 10 ng/ml CTGF recombinante humano durante 72 horas. Algunas CM fueron pre-tratadas con 20 μ g/ml de ODN-antisentido de CTGF o bien ODN-sentido de CTGF como control. La expresión de colágeno IV se analizó por PCR cuantitativa y los niveles de proteína por inmunofluorescencia. La figura muestra a la izquierda la expresión génica de colágeno IV expresada como porcentaje de inhibición, y a la derecha un experimento representativo de 4 experimentos realizados de tinción de colágeno IV por inmunofluorescencia.

Estos datos demuestran que CTGF es un mediador de la producción de fibronectina y colágeno IV causada por AngII en CM, actuando como mediador de la respuesta fibrótica de lAngII (Figura 23).

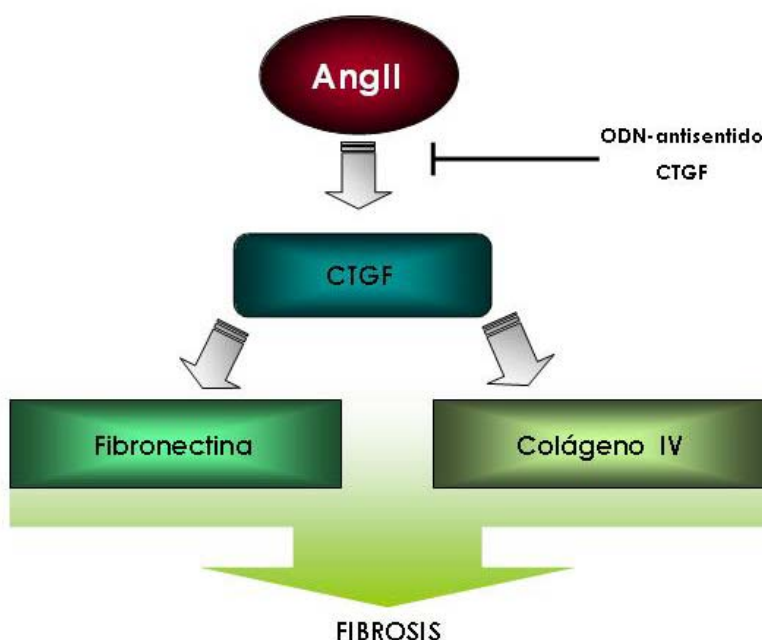


Figura 23: CTGF media la producción de fibronectina y colágeno IV causada por AngII en CM. El tratamiento con ODN-antisentido de CTGF reduce la producción de proteínas de matriz extracelular.

PARTE III: MECANISMOS INTRACELULARES DE REGULACIÓN DE CTGF Y DE SU RESPUESTA FIBRÓTICA. ESTUDIOS *IN VITRO*.

1. Mecanismos intracelulares que participan en la producción de CTGF por AngII en células renales.

Diversos factores implicados en el daño renal, como AngII, TGF- β , estrés mecánico y altas concentraciones de glucosa regulan CTGF^{68,272,256}. En esta tesis hemos utilizado AngII como inductor de CTGF, evaluando los mecanismos implicados en su regulación en células mesangiales de rata (CM de cultivo primario), tubuloepiteliales humanas (línea HK-2). AngII activa múltiples vías de señalización entre las que encontramos proteínas quinasas como MAPK, ROCK, PI3K^{90,107,209}, y factores de transcripción como NF κ B.

Mediante el empleo de diversos inhibidores hemos estudiado el papel de diferentes vías de señalización en la regulación de CTGF inducido por AngII. La implicación de la cascada de MAPK fue evaluada usando inhibidores específicos para la quinasa p38 (SB203580), la quinasa ERK1/2 (PD98059) y la quinasa JNK1/2 (SP600125)^{51,125}. Para inhibir la vía de señalización del factor NF κ B, empleamos Parthenolide y BAY 11-7082^{133,100}. El bloqueo de ROCK se realizó empleando Fasudil e Y-27632²⁰⁹. Utilizamos dos compuestos con diferente función antioxidante con el fin de determinar la participación del estrés oxidativo en la regulación de CTGF: DPI (inhibidor de la enzima NADPH oxidasa) y TIRON (quelante de O²⁻)²¹⁴.

El tratamiento con AngII aumento de manera significativa la producción de CTGF en CM y en células HK-2. En el caso de las CM, observamos que el tratamiento con el inhibidor de la quinasa p38, pero no con los inhibidores de las otras MAPK estudiadas, disminuyó la producción de CTGF causada por AngII (Figura 24B). En estas células, el tratamiento con los compuestos antioxidantes, DPI y TIRON, inhibió significativamente la producción de CTGF causada por AngII, sugiriendo que el estrés oxidativo puede tener un papel importante en la señalización intracelular en CM. Sin embargo, en células HK-2, el bloqueo de las tres MAPK, p38, ERK1/2 y JNK1/2, inhibió la producción de CTGF causada por AngII, efecto que también se observó al inhibir la ROCK (Figura 24A).

Además el bloqueo de la activación de NF κ B, también causó una reducción significativa del CTGF inducido por AngII, en ambos tipos celulares (Figura 24A y B).

Estos datos demuestran una diferente regulación en la producción de CTGF causado por AngII dependiendo del tipo celular, además nos indican que en la regulación de CTGF participan diversas vías de señalización intracelular mostrando un mecanismo complejo.

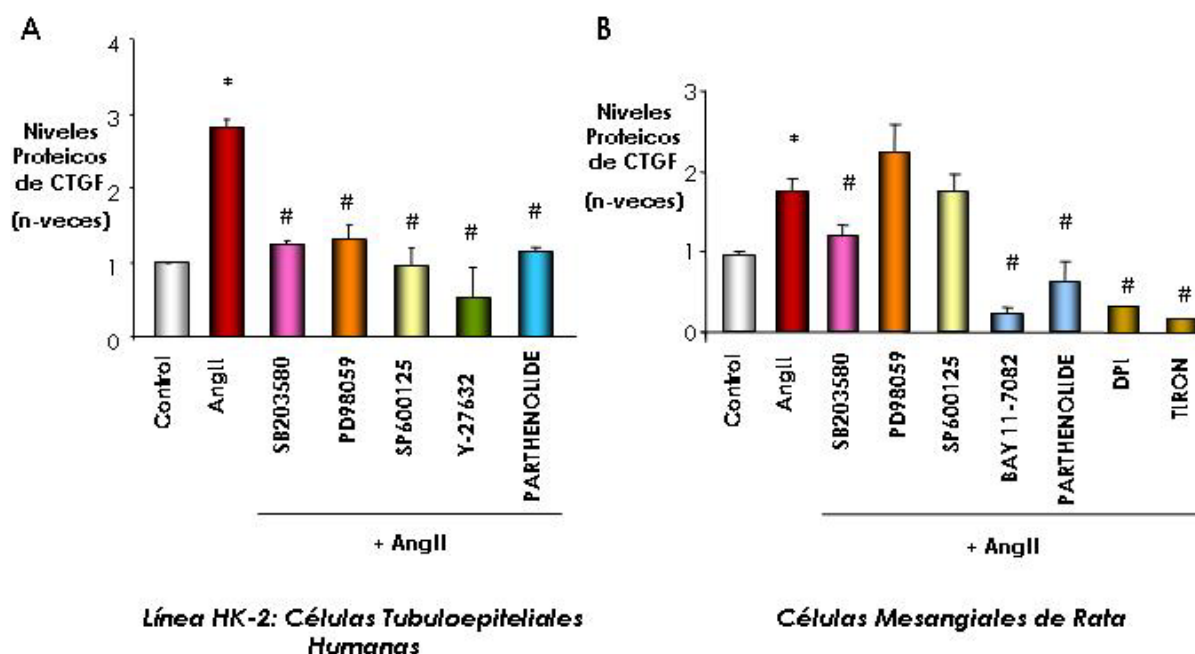


Figura 24: AngII regula la producción de CTGF a través de diferentes mecanismos de señalización intracelular dependiendo del tipo celular. Las CM fueron pretratadas con 10^{-6} mol/L SB203580 (inhibidor de p38), 10^{-5} mol/L PD98059 (inhibidor de ERK1/2), 10^{-5} mol/L SP600125 (inhibidor de JNK1/2), 10^{-6} mol/L BAY 11-7082 y Parthenolide (inhibidores de NF κ B), 10^{-5} mol/L de DPI y TIRON, 10^{-6} mol/L Y-27632, una hora antes de la estimulación con 10^{-7} mol/L AngII durante 24 horas. La producción de CTGF fue analizada por western blot. La figura representa la cuantificación de los niveles proteicos de CTGF en HK-2 (A) y CM (B) como la media \pm EEM de 4 experimentos realizados. * $p < 0,05$ vs control. # $p < 0,05$ vs AngII.

2. Efecto de la presencia simultánea de factores inflamatorios y fibróticos en la expresión de CTGF en CM.

Los resultados obtenidos en el modelo experimental de infusión de AngII muestran que en las diferentes etapas del daño renal coexisten citoquinas inflamatorias, como IL-6 y TNF- α , con factores profibróticos como CTGF. Además diversos estudios han mostrado que existe interrelación entre algunos de estos factores y sus respuestas celulares, como es el caso de AngII y TGF- β^{253} , o como hemos demostrado en esta tesis AngII y CTGF. Por este motivo hemos evaluado el efecto de la presencia simultánea de varias citoquinas y factores de crecimiento sobre la regulación de CTGF, realizando estudios en CM.

Las células fueron co-tratadas con AngII y/o TGF- β , IL-6 e IL-1 β , durante 24 horas y analizamos la producción de CTGF por western blot. En CM, tanto la estimulación con AngII como con TGF- β (Figura 25B), e IL-6 (Figura 25A) causó un aumento en la producción de CTGF observado a las 24 horas de incubación. Sin embargo, la incubación con IL-1 β no causó ningún efecto. La presencia simultánea de TGF- β y AngII mantuvo elevados los niveles proteicos de CTGF, al igual que la coincubación de IL-6 y AngII. Solamente el co-tratamiento con IL-1 β y AngII redujo significativamente la producción de CTGF en CM (Figura 25A).

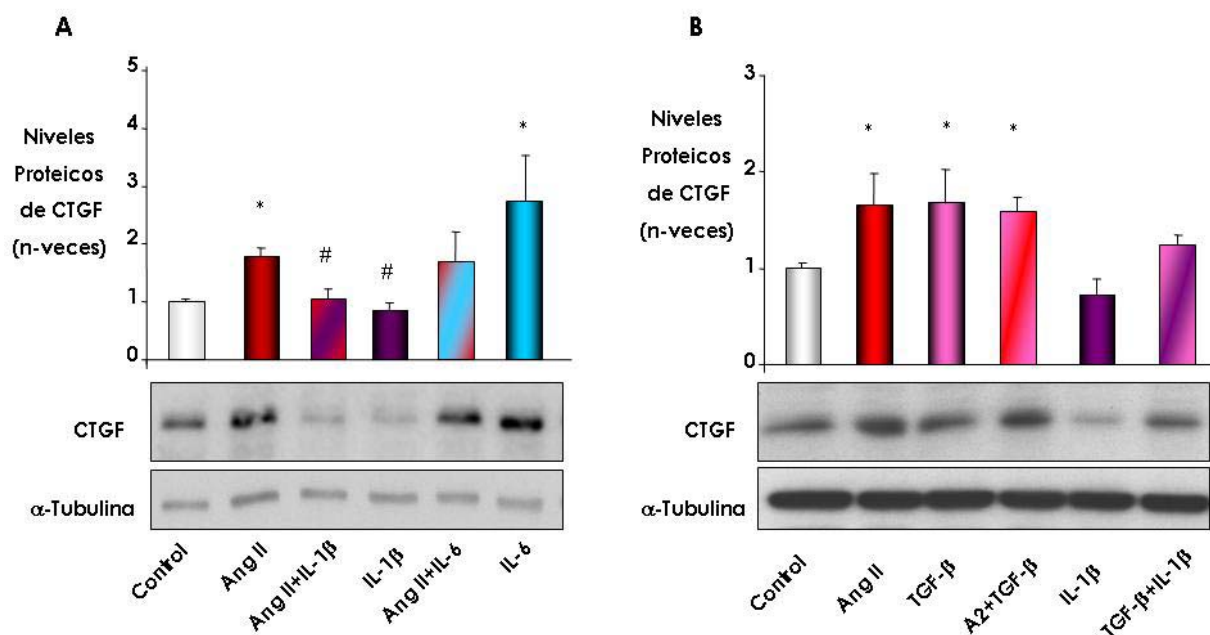


Figura 25: Regulación de CTGF por acción de factores pro-inflamatorios (A) y pro-fibróticos (B). Las CM fueron estimuladas con 10^{-7} mol/L AngII y/o 1 ng/mL IL-1 β , 10 ng/mL IL-6 y 1 ng/mL TGF- β durante 24 h. La figura muestra los niveles proteicos de CTGF expresados como la media \pm EEM de 4 experimentos de western blot realizados y un gel de representativo. * $p < 0,05$ vs control. # $p < 0,05$ vs AngII.

Estos datos sugieren que en situaciones patológicas caracterizadas por un aumento de TGF- β , AngII e IL-6 se potencia la producción de CTGF contribuyendo a la perpetuación de la fibrosis. Por el contrario la presencia de IL-1 β inhibe la producción de CTGF, lo que sugiere que esta citoquina proinflamatoria podría jugar un papel clave en la regulación de CTGF (Figura 26).

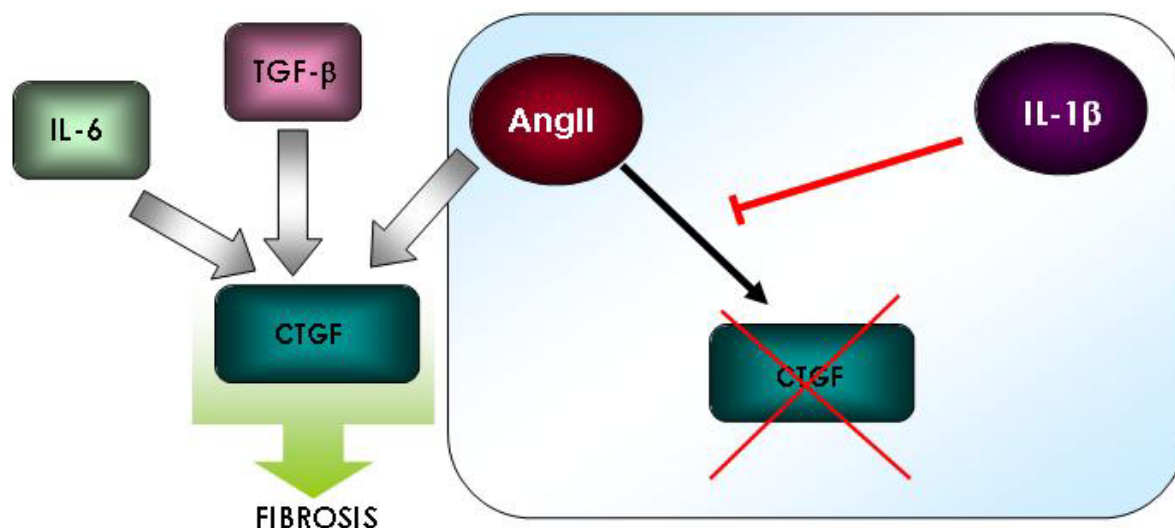
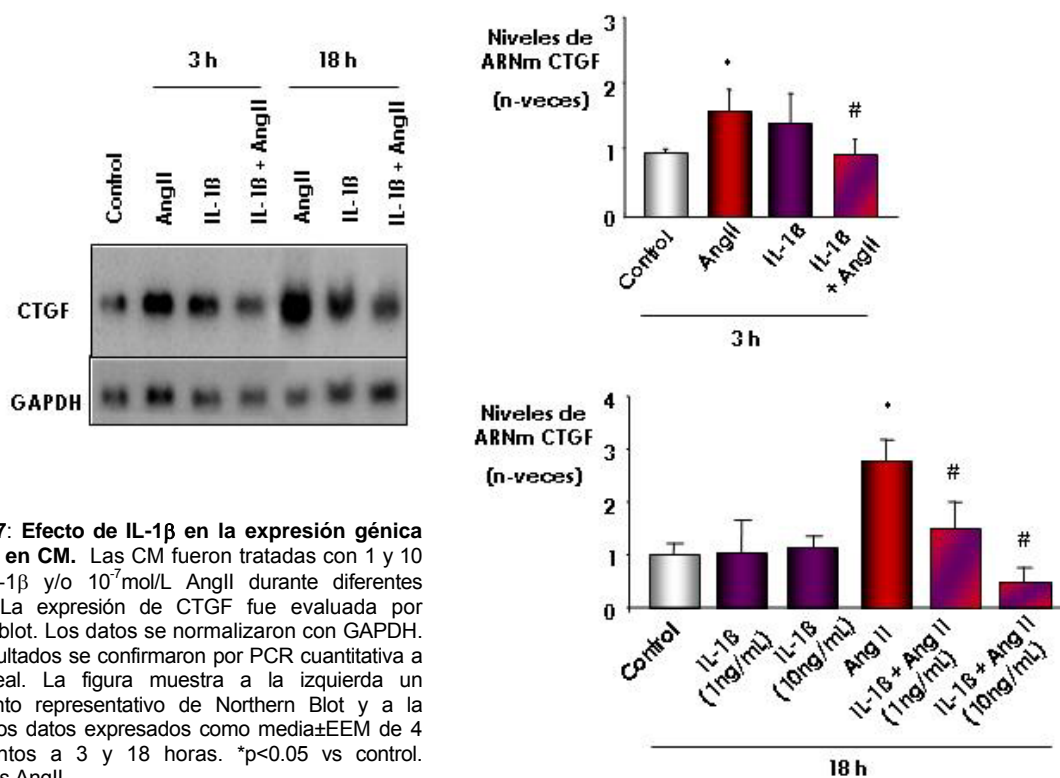


Figura 26: Esquema de la regulación de CTGF por diversos factores proinflamatorios y profibróticos. La AngII, TGF- β e IL-6 inducen la producción de CTGF en CM. Los niveles proteicos de CTGF al combinar la AngII con estas citoquinas permanecen elevados, potenciando el desarrollo de un proceso fibrótico. Por su parte, IL-1 β no solo no aumenta CTGF sino que es capaz de inhibir la producción de CTGF en respuesta a AngII.

3. IL-1 β inhibe la expresión génica y la producción de CTGF inducida por AngII en CM.

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar con más detenimiento el efecto inhibitorio de IL-1 β sobre la producción de CTGF inducida por AngII. Para ello, tratamos a las células con IL-1 β (1-10 ng/ml) y/o AngII (10^{-7} mol/L), durante diferentes tiempos, y evaluamos los niveles de expresión de ARNm de CTGF mediante Northern Blot.

AngII aumentó de forma rápida y mantenida la expresión de CTGF en CM (Figura 27). El tratamiento con IL-1 β causó un ligero, aunque no significativo, aumento en la expresión de ARNm de CTGF a las 3 horas de incubación, el cual disminuyó hasta niveles controles a las 18 horas. La coincubación con AngII e IL-1 β bloqueó el aumento en la expresión de CTGF que causa AngII a todos los tiempos estudiados. Este efecto era dependiente de la dosis, con una respuesta máxima a la dosis de 10 ng/mL de IL-1 β .



Estudiamos los niveles proteicos de CTGF mediante Western Blot, y observamos que la AngII induce de forma significativa la producción de CTGF a las 24 horas, mientras que IL-1 β no fue capaz de inducir su síntesis. La presencia simultánea de AngII e IL-1 β , inhibió significativamente la producción de CTGF causada por AngII (Figura 28).

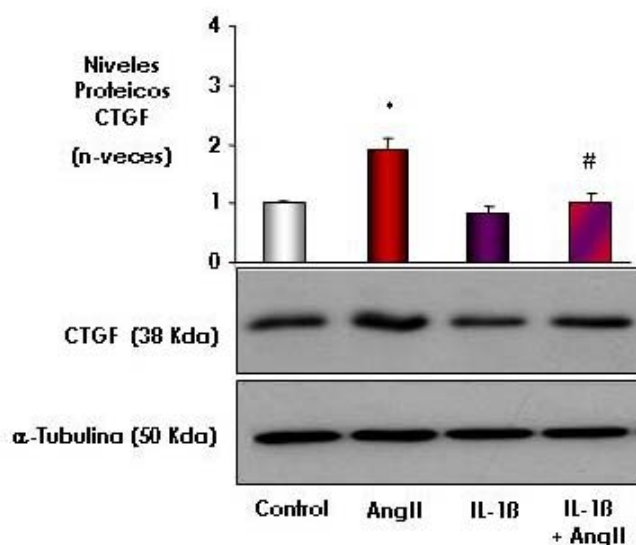


Figura 28: Efecto de IL-1 β en la producción de proteína CTGF en CM. Las células fueron tratadas con 1ng/mL IL-1 β y/o 10⁻⁷mol/L AngII durante 24 horas. Los niveles de proteína CTGF fueron medidos por Western blot. La figura muestra un gel representativo de 1 experimento y los niveles proteicos expresados como la media \pm EEM de 6 experimentos realizados. *p<0,05 vs control. #p<0,05 vs AngII.

Este efecto inhibitorio observado, no era debido a la inhibición general de la expresión proteica, ya que los niveles de α -tubulina y los niveles de proteínas totales no estaban modificados (determinado por la incorporación de Leucina ³[H]) (Figura 29).

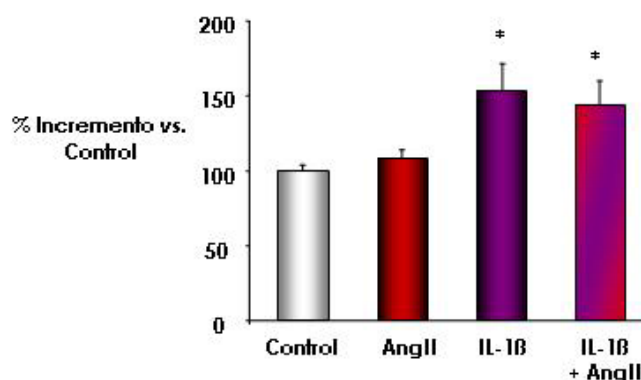


Figura 29: Efecto de la coincubación con AngII e IL-1 β en la síntesis de proteína total. Las células fueron tratadas con 10⁻⁷ mol/L de AngII y 1ng/mL de IL-1 β durante 24 horas. La figura muestra los datos expresados como la media \pm EEM de 9 experimentos. *p<0.05 vs control.

4. IL-1 β disminuye la expresión génica y la producción de colágeno IV inducidas por AngII y CTGF en CM.

Previamente hemos demostrado que CTGF es mediador de la producción de colágeno IV causada por AngII (Figura 22). Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si el efecto inhibitorio de IL-1 β observado en la expresión de CTGF, se producía también en la regulación de colágeno IV inducido por AngII.

En CM, AngII aumenta la expresión de procolágeno IV al cabo de 18 horas de incubación y la producción de colágeno IV (tanto soluble como asociado a la célula) aumenta de forma significativa a las 24 horas (Figura 30). IL-1 β aumenta la expresión de proteínas de matriz extracelular^{175,234}, pero hemos observado que no tuvo efecto en la expresión y producción de colágeno IV en CM. Además, IL-1 β inhibió la expresión de colágeno IV inducida por AngII, así como la proteína soluble y asociada a la célula (Figura 30), mostrando una regulación similar a lo observado con CTGF.

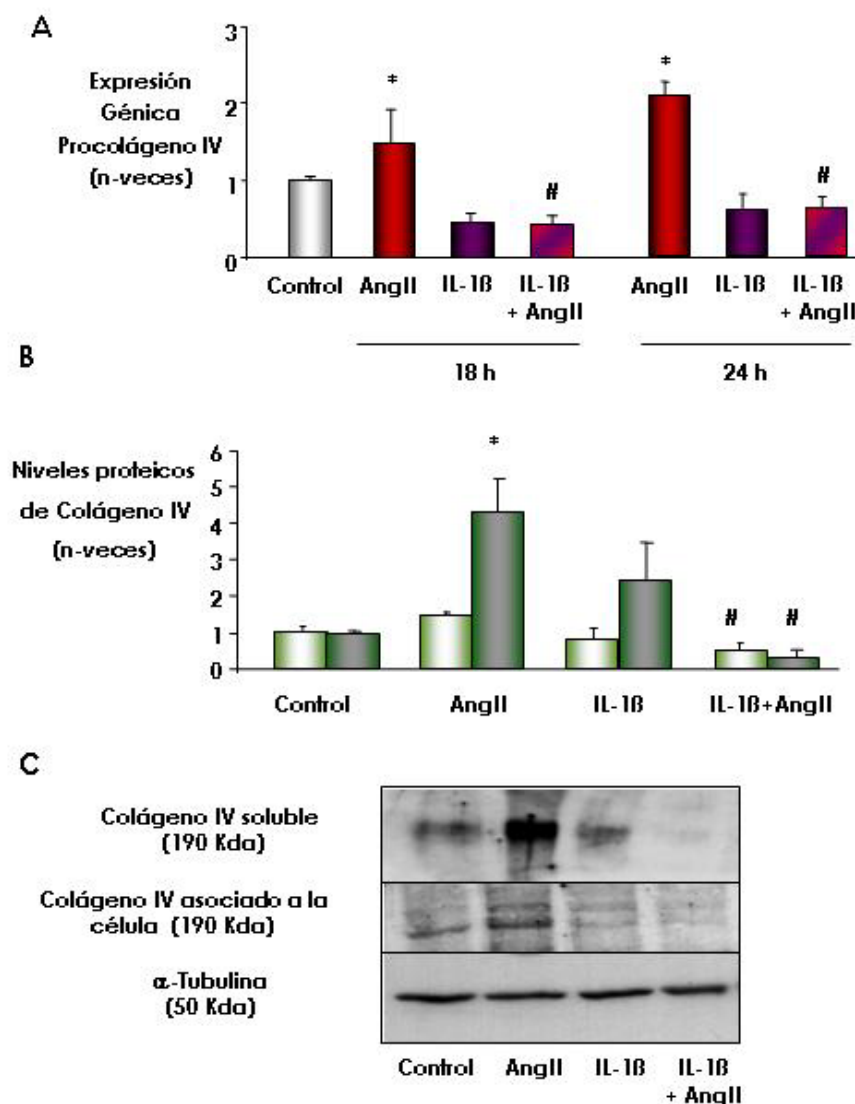


Figura 30. (A). Efecto de la coincubación de IL-1β y AngII en la expresión y producción de colágeno IV. Las células fueron estimuladas con 1ng/mL IL-1β y/o 10^{-7} mol/L AngII durante 18 y 24 horas. **(A).** La figura muestra los niveles de expresión génica de procolágeno IV expresados como media±EEM de 6 experimentos de PCR cuantitativa. La figura **(B)** muestra los datos como media±EEM de 3 experimentos de western blot. La figura **(C)** muestra un gel de western blot representativo de colágeno IV soluble y asociado a la célula al cabo de 72 horas de 3 experimentos de 72 horas realizados. ■ Colágeno asociado a la célula. ■ Colágeno soluble. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs AngII.

Los siguientes experimentos fueron diseñados para demostrar si el efecto observado en la inhibición de colágeno IV por IL-1β es debido a su efecto inhibitorio sobre CTGF. Las células fueron tratadas con CTGF (10 ng/ml) y/o AngII (10^{-7} mol/L) observando un incremento en los niveles de colágeno IV (Figura 31). El co-tratamiento con 1ng/mL IL-1β, inhibió la producción de colágeno IV causado por AngII y CTGF solos o en combinación, indicando que IL-1β regula CTGF a dos niveles, por inhibición de su síntesis y de sus respuestas celulares.

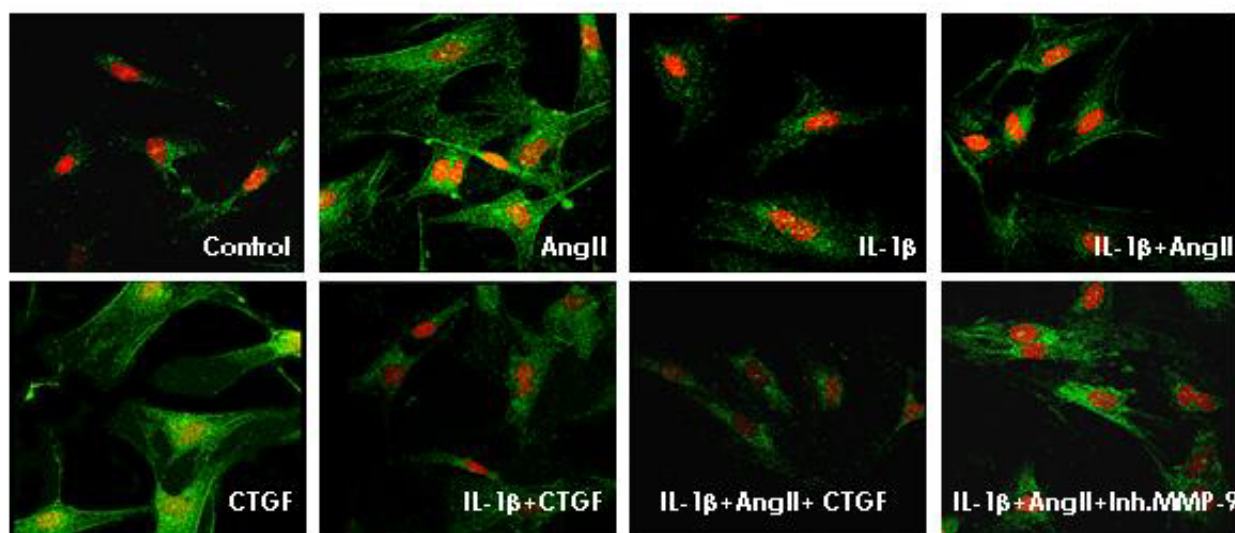


Figura 31: Papel de CTGF en el efecto inhibitorio de IL-1 β en la regulación de colágeno IV inducido por AngII. Las CM fueron estimuladas con 10^{-7} mol/L AngII, 10ng/mL CTGF 1ng/mL IL-1 β durante 72 horas. En algunos puntos, las células fueron pretratadas con Inhibidor I de MMP-9, 1 hora antes de la estimulación. La figura muestra imágenes de microscopía confocal de un experimento representativo de tinción de colágeno IV por inmunofluorescencia de 4 realizados.

5. Mecanismos intracelulares que participan en la expresión de Colágeno IV por AngII en CM.

Estudios previos han demostrado que AngII regula CTGF a través de su receptor AT $_1$ y de la activación de vías de señalización como MAPK, PKC y ROCK^{90,107,209}. En esta tesis, hemos demostrado que en CM, AngII induce CTGF a través de la activación de p38 y NF κ B. Para profundizar en este proceso hemos investigado las rutas de señalización implicadas en la regulación de colágeno IV causado por AngII. En CM, mediante el empleo de inhibidores específicos de las diferentes rutas, hemos observado que la inhibición del factor de transcripción NF κ B y de la quinasa p38, pero no de ERK o JNK, disminuyeron la expresión de colágeno IV inducido por AngII (Figura 32), mostrando una regulación similar a la de CTGF.

Todos estos resultados sugieren que CTGF es un mediador de la producción de colágeno IV causada por AngII, y esta regulación requiere la activación de la ruta de la quinasa p38 y NF κ B en las CM.

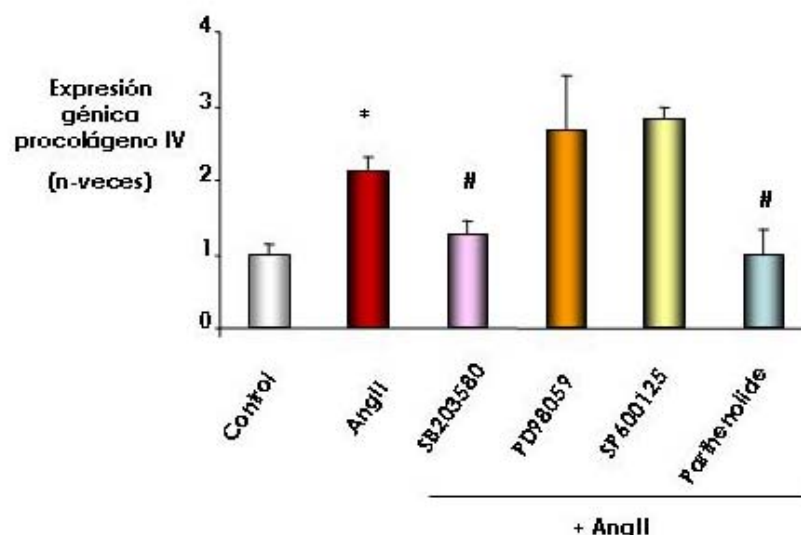


Figura 32: AngII regula colágeno IV a través de la activación de la quinasa p38 y NF κ B. Las CM fueron pretratadas con 10^{-6} mol/L SB203580 (inhibidor de p38), 10^{-5} mol/L PD98059 (inhibidor de ERK1/2), 10^{-5} mol/L SP600125 (inhibidor de JNK1/2), 10^{-6} mol/L Parthenolide (inhibidor de NF κ B), una hora antes de la estimulación con 10^{-7} mol/L AngII durante 24 horas. La figura muestra los datos como media \pm EEM de 4 experimentos de PCR cuantitativa de procolágeno IV. *p<0.05 vs control. #p<0.05 vs AngII.

6. IL-1 β no modifica la expresión de TGF- β y Trombospondina-1 causada por AngII en CM.

AngII y TGF- β comparten muchas respuestas implicadas en la regulación de la matriz^{15,200}. AngII es capaz de incrementar la expresión de ARNm de TGF- β , la producción de proteína y la activación de TGF- β latente, a través de un proceso mediado por trombospondina-1¹⁵⁶. En CM, hemos observado que IL-1 β y AngII inducen la expresión de TGF- β , y que la presencia de ambos estímulos juntos no modifica estos niveles (Figura 33). Hemos observado que la coincubación de IL-1 β y AngII también aumenta la expresión de trombospondina-1, no observándose diferencias respecto cada estímulo por separado (Figura 33). Estos datos sugieren que IL-1 β ejerce un efecto diferente en la regulación de CTGF y TGF- β .

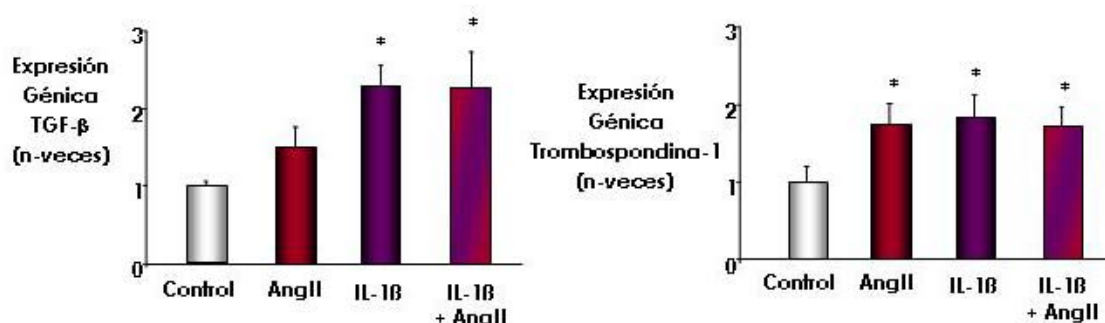


Figura 33: La coincubación de IL-1 β y AngII no modifica la expresión génica de TGF- β ni Trombospondina-1. Las células fueron incubadas con 1ng/mL IL-1 β y/o 10⁻⁷mol/L AngII durante 24 horas. Las gráficas de barras muestran los datos como media \pm EEM de 4 experimentos de PCR cuantitativa a tiempo real. * p<0.05 vs Control.

7. IL-1 β inhibe la síntesis de CTGF y colágeno IV a través de la quinasa ERK1/2.

A continuación, evaluamos los mecanismos moleculares implicados en la inhibición de la producción de CTGF y colágeno IV causada por IL-1 β . IL-1 β activa varias señales intracelulares que comparte con AngII, como MAPK, ROCK y PI3K/Akt^{48,49,101,200}. Primero, hemos evaluado el papel potencial de varias señales intracelulares en el efecto inhibitorio de IL-1 β sobre la regulación de CTGF, usando inhibidores específicos para cada ruta: Inhibidor de p38, SB203580 (10⁻⁶mol/L); inhibidor de ERK1/2, PD98059 (10⁻⁵mol/L); inhibidor de JNK1/2, SP600125 (10⁻⁵mol/L); inhibidores de ROCK, Fasudil e Y-27632 (10⁻⁶mol/L); y inhibidor de PI3K, wortmannina (10⁻⁹mol/L). De los inhibidores para las rutas de la tres MAPK estudiadas, únicamente el inhibidor de ERK1/2 (PD98059), pero no el de p38 ni JNK1/2, bloqueó significativamente el efecto inhibitorio de IL-1 β sobre CTGF, tanto a nivel de expresión génica como a nivel proteico (Figura 34). Los dos inhibidores de ROCK (Y-27632 y Fasudil) no atenuaron el efecto inhibitorio de IL-1 β . El tratamiento con Wortmannina (inhibidor de PI3K/Akt) no afectó a la inhibición de CTGF causada por IL-1 β .

Estos datos sugieren que el efecto inhibitorio de IL-1 β parece estar mediado por la activación de la cascada de señalización de ERK1/2.

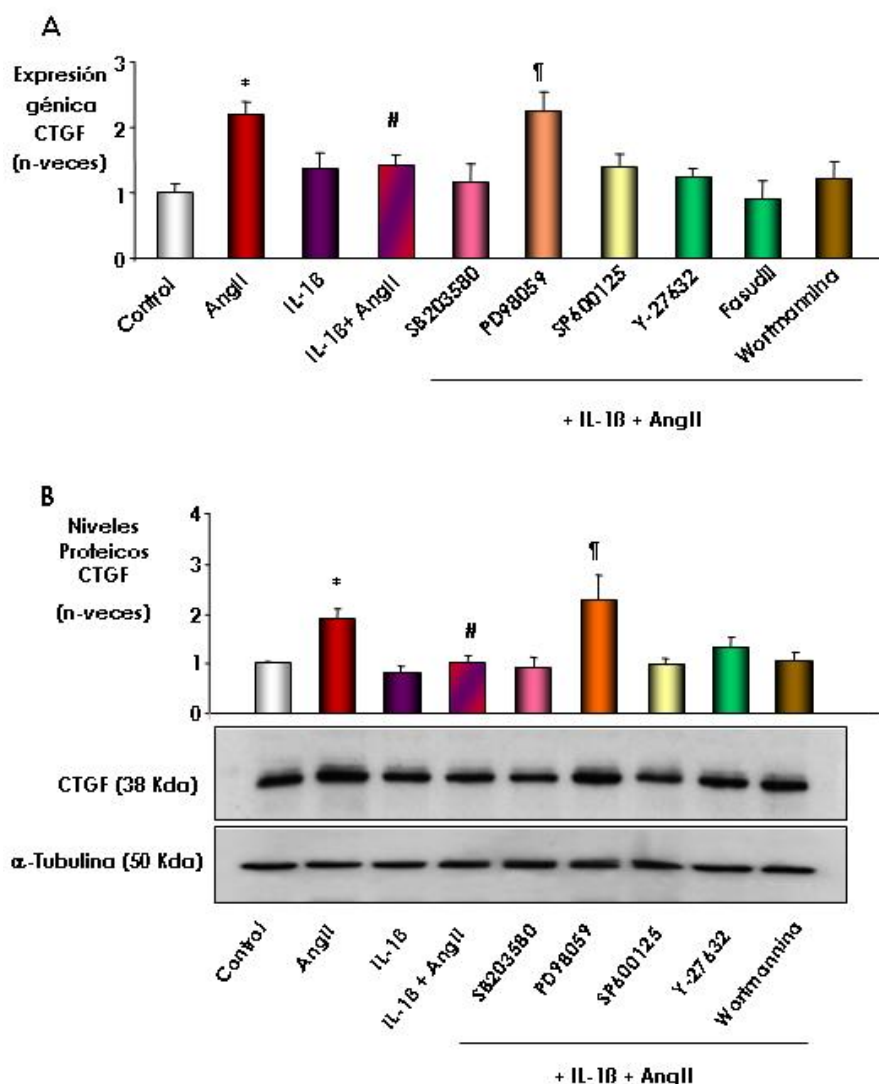


Figura 34. El efecto inhibitorio de IL-1 β sobre CTGF inducido por AngII es mediado por la quinasa ERK1/2. Las CM se trataron con 10⁻⁶mol/L SB203580 (inhibidor de p38), 10⁻⁵mol/L PD98059 (inhibidor de ERK1/2), 10⁻⁵mol/L SP600125 (inhibidor de JNK1/2), 10⁻⁶mol/L Fasudil e Y-27632 (inhibidores de ROCK), y 10⁻⁹mol/L wortmannina (inhibidor de PI3K) 1 hora antes de estimular con 1ng/mL IL-1 β y/o 10⁻⁷mol/L AngII 24 horas. La figura (A) muestra los datos como media \pm EEM de 7 experimentos de PCR cuantitativa. La figura (B) muestra los datos como media \pm EEM de 5 experimentos de western blot y un gel representativo. * p<0.05 vs control. # p<0.05 vs AngII. †p<0.05 vs IL-1 β +AngII.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar que señales intracelulares estaban implicadas en la inhibición de colágeno IV causada IL-1 β . Como se muestra en la figura 35, solamente el pretratamiento con el inhibidor de ERK1/2 (PD98059), pero no con los de las otras MAPK, ni con los de ROCK ni PI3K, significativamente recuperó los niveles de expresión génica de procolágeno IV, mostrando una respuesta similar a lo observado para CTGF.

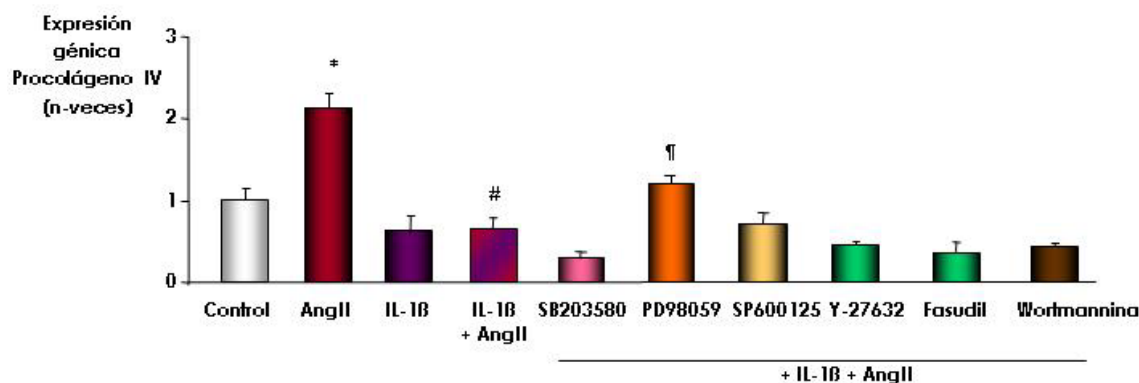


Figura 35. El efecto inhibitorio de IL-1 β sobre la regulación de colágeno IV inducido por AngII es mediado por la activación de la quinasa ERK1/2. Las CM fueron pretratadas con 10⁻⁶mol/L SB203580 (inhibidor de p38), 10⁻⁵mol/L PD98059 (inhibidor de ERK1/2), 10⁻⁵mol/L SP600125 (inhibidor de JNK1/2), 10⁻⁶mol/L Fasudil e Y-27632 (inhibidores de ROCK), y 10⁻⁹mol/L wortmannina (inhibidor de PI3K) durante 1 hora antes de la estimulación con 1ng/mL IL-1 β y/o 10⁻⁷mol/L AngII durante 24 horas. Las figuras muestran los datos como media \pm EEM de 5 experimentos de PCR cuantitativa para el análisis de la expresión de procolágeno IV. *p<0.05 vs control. #p<0.05 vs AngII. †p<0.05 vs IL-1 β +AngII.

Estos resultados sugieren que en CM AngII regula CTGF y colágeno IV a través de la activación de varias rutas de señalización entre las que se encuentra la quinasa p38, mientras que ERK1/2 participa en el efecto inhibitorio de IL-1 β (Figura 36).

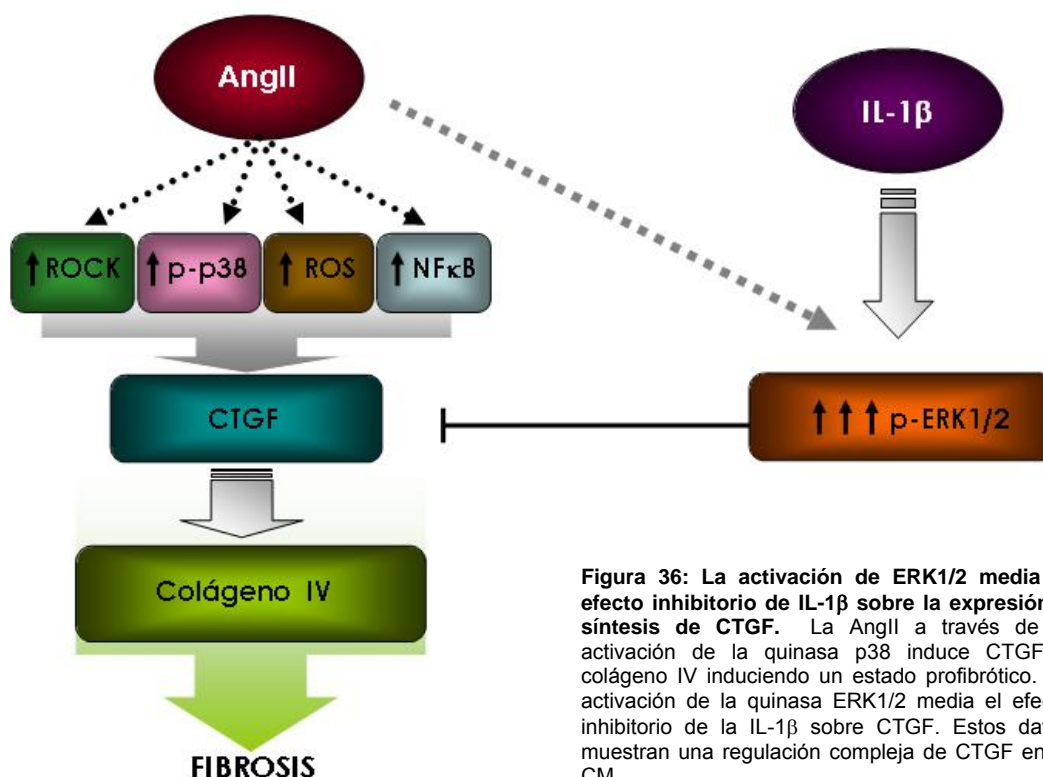


Figura 36: La activación de ERK1/2 media el efecto inhibitorio de IL-1 β sobre la expresión y síntesis de CTGF. La AngII a través de la activación de la quinasa p38 induce CTGF y colágeno IV induciendo un estado profibrótico. La activación de la quinasa ERK1/2 media el efecto inhibitorio de la IL-1 β sobre CTGF. Estos datos muestran una regulación compleja de CTGF en la CM.

8. La coincubación de IL-1 β y AngII aumenta de forma sinérgica la activación de ERK1/2, pero no p38, JNK y PI3K/AKT.

En CM, IL-1 β y AngII inducen la fosforilación de las tres rutas de la cascada de MAPK, ERK, p38 y JNK^{51,75,101}. Nuestro siguiente objetivo fue evaluar el efecto de IL-1 β y AngII solas y en combinación sobre la activación de estas quinasas.

En primer lugar, estudiamos la activación de la quinasa ERK1/2 al haber observado que está implicada en el efecto inhibitorio de IL-1 β sobre la síntesis de CTGF y colágeno IV. Observamos que tras apenas 2 minutos de estimulación con AngII, se produjo un aumento en la fosforilación de ERK1/2, que permanecía elevado hasta los 30 minutos, pero que disminuía a niveles controles a los 50 minutos (Figura 37). Por su parte, IL-1 β presentó una respuesta algo más retardada, incrementando los niveles de fosforilación de ERK1/2 a los 30 minutos y permaneciendo elevado hasta los 50 minutos. La presencia simultánea de IL-1 β y AngII, causó un aumento sinérgico en la activación de ERK1/2 a los 30 minutos. Evaluamos el efecto a tiempos más largos, mostrando que a las 24 horas no se observa activación de ERK1/2 por ninguno de los dos estímulos.

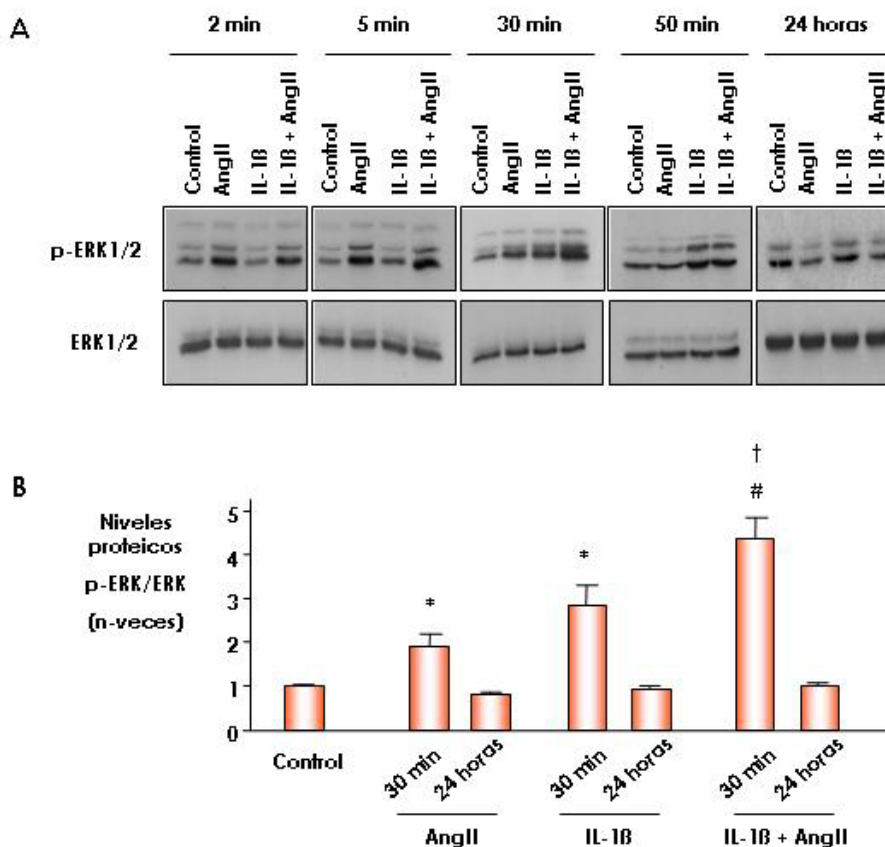


Figura 37. La coincubación de IL-1 β y AngII incremento sinérgicamente la activación de ERK en CM. Las CM fueron coincubadas con 1ng/mL IL-1 β y/o 10⁻⁷mol/L AngII durante diferentes tiempos. La figura (A) muestra un experimento de western blot para ERK1/2 fosforilado (p-ERK1/2) y ERK1/2 total representativo de 4 realizados y en la figura (B) los datos como media \pm EEM de 4 experimentos. * p<0.05 vs. control. # p<0.05 vs. AngII. † p<0.05 vs. IL-1 β .

Estudiamos la activación de las quinasas p38, JNK1/2 y PI3K/Akt, y observamos que al estimular con AngII y/o IL-1 β la actividad de estas quinasas aumenta, aunque en ninguno de los casos la coincubación causó un aumento sinérgico en sus niveles de fosforilación (Figura 38). A este respecto debemos recordar que p38, JNK y PI3K/Akt no participan en el efecto inhibitorio de IL-1 β sobre la expresión de CTGF y colágeno IV inducida por AngII, como se mostró en las figuras 34 y 35 (página 57).

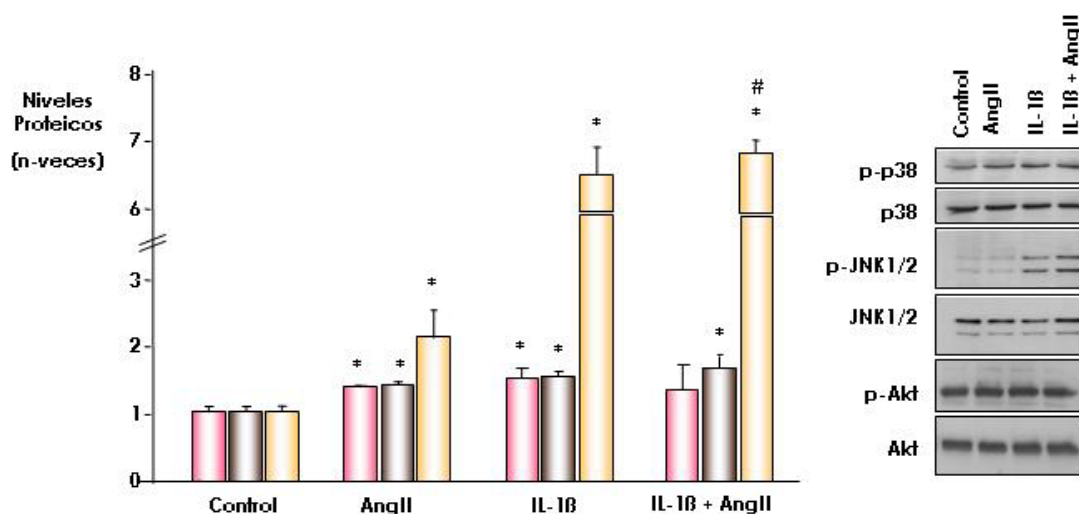


Figura 38. Efecto de la coincubación de IL-1 β y AngII en la activación de varias quinasas (p38, JNK, PI3K/Akt). La figura muestra a la izquierda los datos como media \pm EEM de 3 experimentos de 30 minutos de incubación realizados y a la derecha un gel de western blot representativo. *p<0.05 vs. control. #p<0.05 vs. AngII.

Estos datos sugieren que IL-1 β y AngII causan la activación sinérgica de la vía ERK1/2 la cual participa en la inhibición de la expresión y la producción de CTGF y colágeno IV.

9. Efecto sinérgico de la coincubación de IL-1 β y AngII sobre la expresión y actividad de MMP-9. Papel de la quinasa ERK1/2.

La acumulación de proteínas de matriz extracelular mesangial, está regulado por el balance existente entre la síntesis y la degradación, esta última controlada por las MMPs^{54,55,206,265}. Hemos estudiado el efecto de IL-1 β y AngII en la expresión y actividad de MMP-9, principal enzima degradadora de colágeno IV y V^{54,265}. Las células fueron tratadas con IL-1 β y/o AngII y analizamos la expresión génica mediante PCR a tiempo real, observando un efecto sinérgico sobre la regulación del ARN de MMP-9 al coincubar con ambas citoquinas (Figura 39A). La coincubación de IL-1 β y AngII incremento también de forma sinérgica la actividad gelatinolítica de MMP-9, determinado por ensayo de zimografía (Figura 39B).

En CM, IL-1 β induce altos niveles de MMP-9 regulado por MAPK⁵⁴. Hemos evaluado el papel de este sistema de señalización intracelular en la activación sinérgica de MMP-9 causada por la coincubación de IL-1 β y AngII. Solamente el tratamiento con el inhibidor de ERK1/2 (PD98059) disminuyó el efecto sinérgico de la expresión génica y la actividad de MMP-9 (Figuras 39A y B). Por el contrario, el resto de inhibidores utilizados no tuvieron efecto en este proceso.

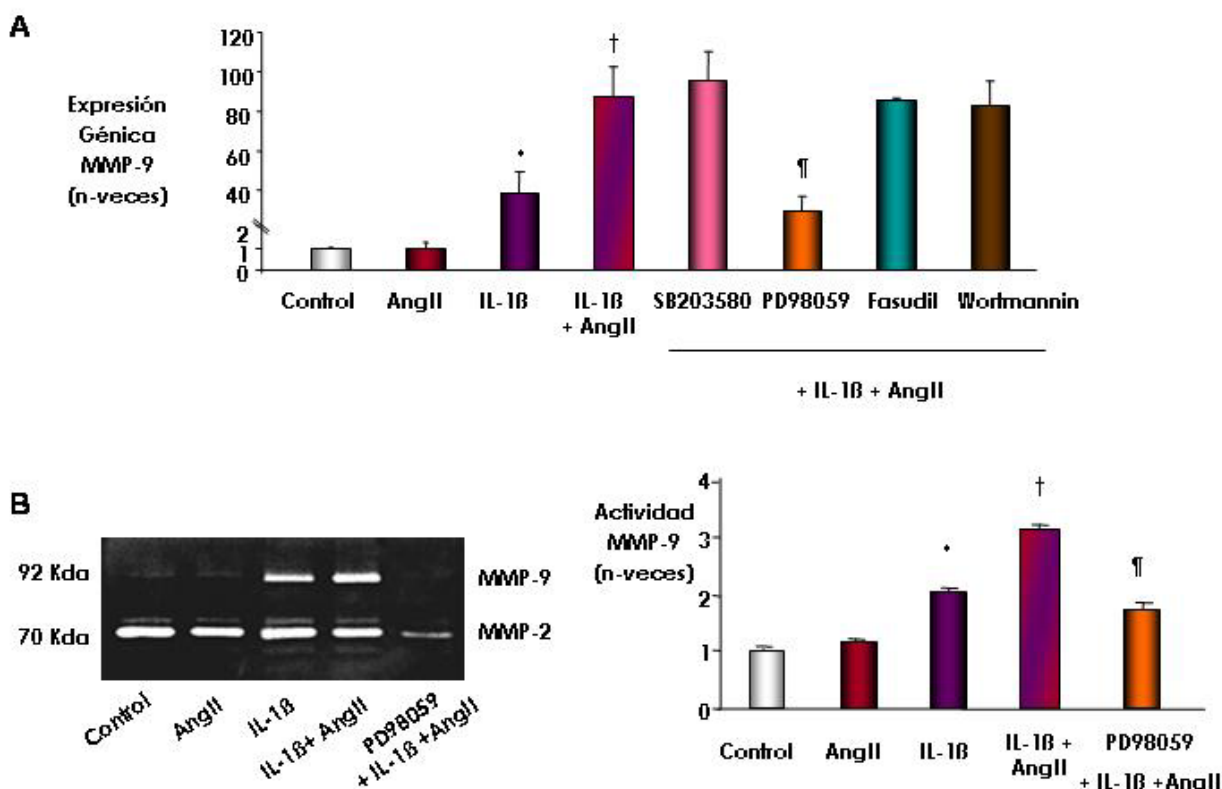


Figure 39. (A). La coincubación de IL-1 β y AngII incrementa la expresión y actividad de MMP-9 en CM. Las células fueron pretratadas con 10⁻⁵ mol/L de PD98059, SP600125, 10⁻⁶ mol/L de SB203580 y Fasudil; y 10⁻⁹ mol/L Wortmannina durante 1 hora y después con 1 ng/mL IL-1 β y/o 10⁻⁷ mol/L AngII durante 24 horas. Los datos se muestran como media \pm EEM de 6 experimentos de PCR cuantitativa. **(B).** Modulación de la actividad gelatinolítica de MMP-9 y MMP-2 tras la estimulación con AngII e IL-1 β durante 72 horas. La banda superior corresponde a MMP-9 (~90kDa), y la inferior a MMP-2 (~70kDa). A la izquierda se muestra una zimografía representativa y a la derecha los datos como media \pm EEM de 3 experimentos. * p<0.05 vs control. † p<0.05 vs IL-1 β . ‡ p<0.05 vs AngII+IL-1 β .

Evaluamos los niveles de expresión de la proteína inhibidora de la metaloproteasa tisular-1 (TIMP-1), principal inhibidor endógeno de MMP-9⁴. La coincubación de IL-1 β y AngII, incremento la expresión de TIMP-1 respecto a los controles (Figura 40), pero no lo aumento significativamente respecto cada citoquina por separado, indicando que la activación sinérgica de MMP-9 no se debe a una disminución en los niveles de expresión de su inhibidor endógeno TIMP-1. Además estos datos muestran correlación en el tiempo entre el aumento en la actividad de MMP-9 y la inhibición de colágeno IV, sugiriendo que esta proteína esta siendo degradada.

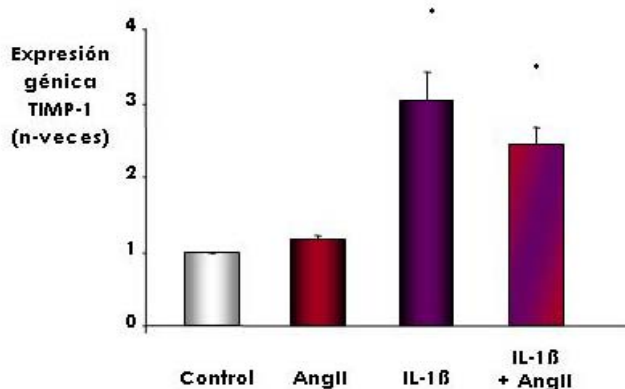


Figura 40: La coincubación de IL-1 β y AngII incrementa la expresión de TIMP-1 en CM. Las CM fueron tratadas con 1ng/mL IL-1 β y/o 10⁻⁷ mol/L AngII durante 24 h. Los datos se muestran como media \pm EEM de 6 experimentos de PCR cuantitativa. *p<0.05 vs. control.

Para determinar la contribución de la MMP-9 sobre la inhibición de colágeno tipo IV por parte de IL-1 β , hemos utilizado un inhibidor de MMP-9^{54,55}. Las CM fueron pretratadas con el Inhibidor I de MMP-9 antes de la estimulación con IL-1 β y/o AngII durante 72 horas, y los niveles de colágeno IV secretado fueron analizados en el medio usando un kit de ELISA para colágeno IV. La inhibición de MMP-9, recuperó los niveles de colágeno tipo IV secretado (Figura 41) y el asociado a la célula (Figura 31, página 55), impidiendo el efecto inhibitorio de la IL-1 β sobre la respuesta de AngII, sugiriendo que la regulación de MMP-9 por la IL-1 β juega un papel importante en la degradación de colágeno IV.

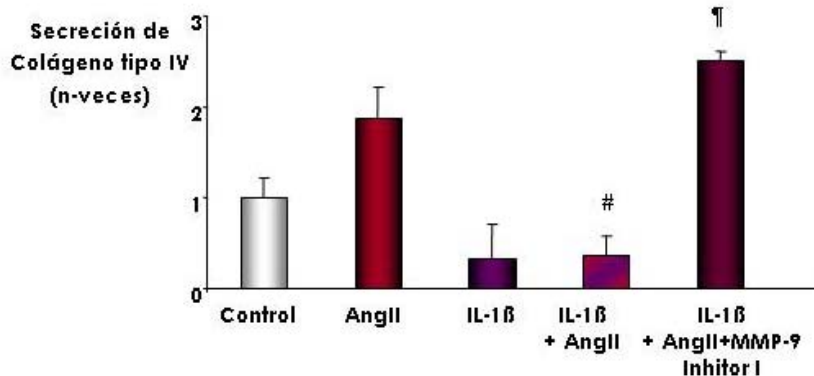


Figura 41: La inhibición de MMP-9 recupera los niveles de colágeno IV inhibidos por IL-1 β . Las células fueron tratadas con 10⁻⁶ mol/L de Inhibidor I de MMP-9 1 hora antes de la estimulación con 10⁻⁷ mol/L AngII y/o 1ng/ml IL-1 β durante 72 h. Los datos se muestran como los niveles de proteína liberada al medio como la media \pm DS de 2 experimentos analizados por ELISA para colágeno IV. #p<0.05 vs. AngII. †p<0.05 vs. IL-1 β . ††p<0.05 vs. AngII+IL-1 β .

Estos datos demuestran que IL-1 β es capaz de bloquear en parte la respuesta fibrótica de AngII, inhibiendo tanto la expresión y producción de CTGF como de colágeno IV. Además hemos observado que el efecto inhibitorio de IL-1 β sobre CTGF no se limita solo a inhibir su síntesis sino que también inhibe su acción inductora de colágeno IV. Hemos determinado que el mecanismo por el cual IL-1 β causa su efecto inhibitorio se debe a la activación sinérgica de la quinasa ERK1/2. Además esta quinasa modula la activación sinérgica de MMP-9, principal molécula implicada en la degradación de colágeno IV (Figura 42).

Nuestros resultados sugieren que la regulación de CTGF y su efecto sobre la fibrosis es un proceso complejo en el que intervienen reguladores positivos y negativos de su síntesis como las citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-1 β respectivamente, que podrían jugar un papel clave en la resolución o progresión de la fibrosis renal.

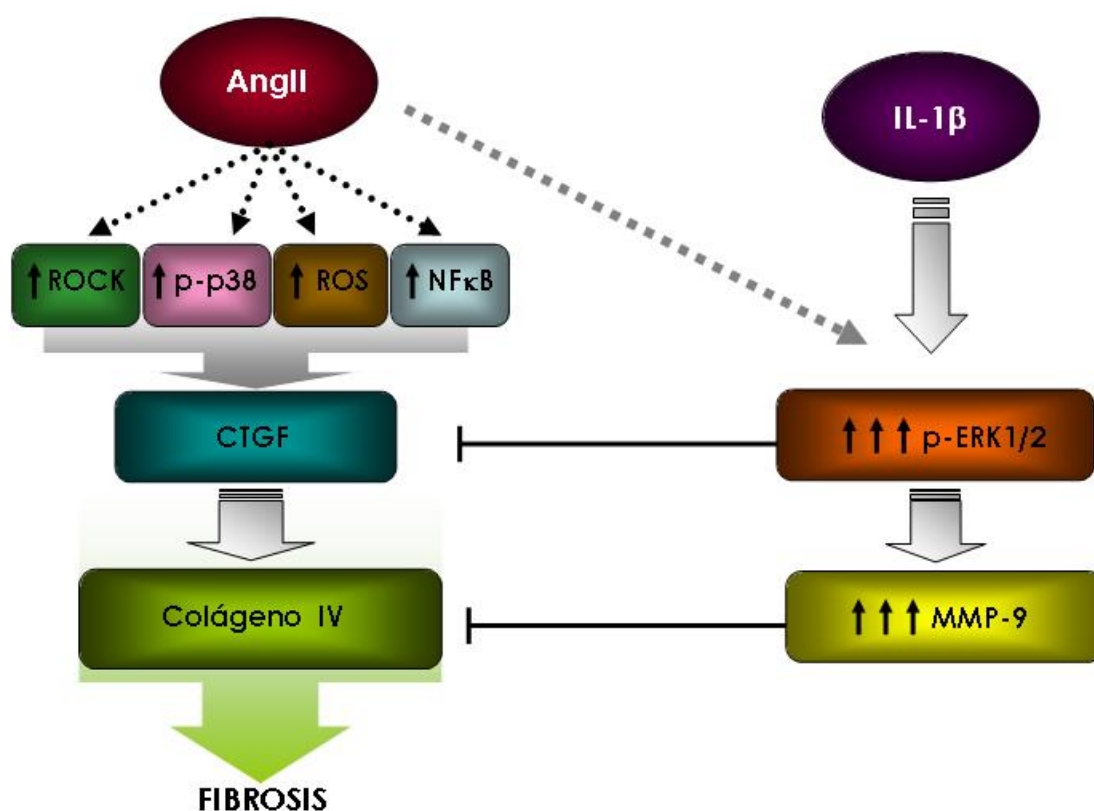


Figura 42: Esquema representativo del mecanismo por el cual IL-1 β ejerce su efecto inhibitorio sobre CTGF y colágeno IV.

PARTE IV: EFECTO DE CTGF EN EL RIÑÓN.

1. Efecto de la Administración sistémica de CTGF en el riñón: Estudios experimentales en ratón.

Para investigar el efecto directo *in vivo* de CTGF en el riñón hemos realizado un modelo agudo de administración intraperitoneal de CTGF en ratones. Hemos usado ratones C57BL/6 que fueron tratados con una única dosis de CTGF de 2,5 ng/g de peso o salino (grupo control), y que fueron sacrificados 24 horas después (n=7 animales por grupo).

El día del sacrificio se recogieron muestras de sangre para analizar los niveles de urea y creatinina en plasma. No se observaron diferencias significativas en los niveles de ambos parámetros entre los animales tratados con CTGF y los controles. Además se recogieron muestras de orina en las que analizamos los niveles de proteína y creatinina. Tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, sugiriendo que al menos a la dosis usada, CTGF no induce pérdida de la función renal tras 24h de administración (Figura 43).

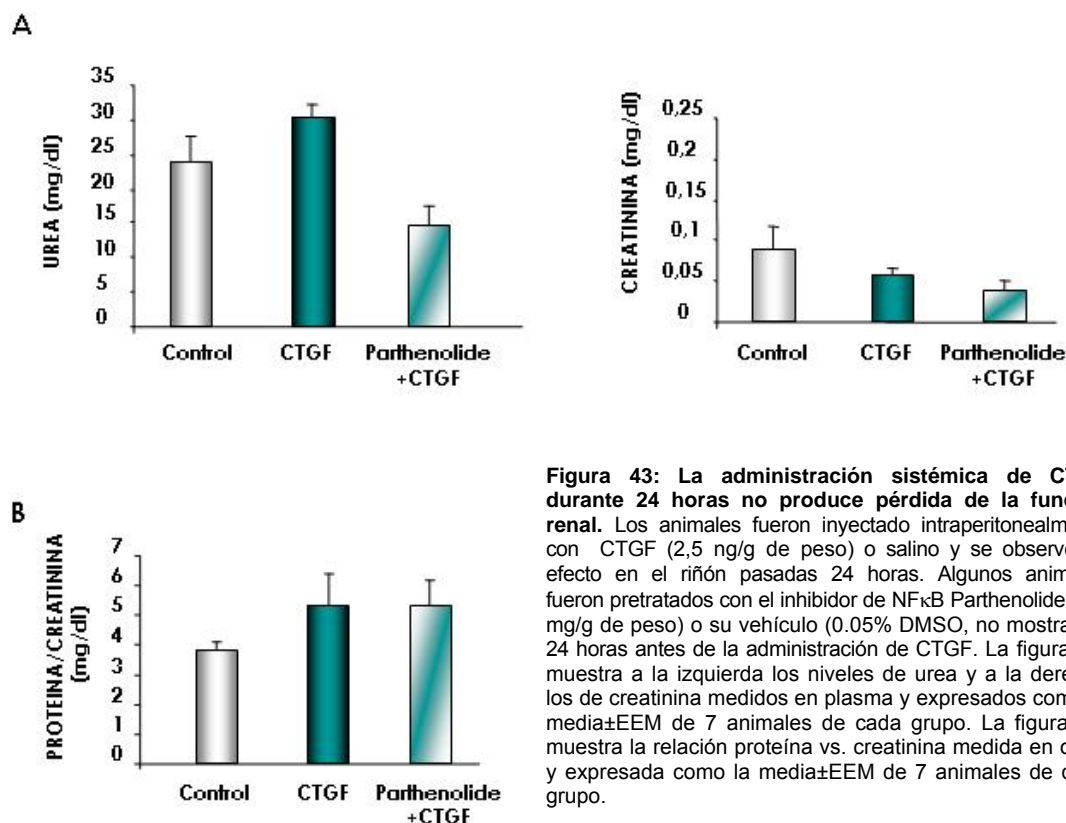


Figura 43: La administración sistémica de CTGF durante 24 horas no produce pérdida de la función renal. Los animales fueron inyectado intraperitonealmente con CTGF (2,5 ng/g de peso) o salino y se observó su efecto en el riñón pasadas 24 horas. Algunos animales fueron pretratados con el inhibidor de NF κ B Parthenolide (3,5 mg/g de peso) o su vehículo (0.05% DMSO, no mostrado), 24 horas antes de la administración de CTGF. La figura (A) muestra a la izquierda los niveles de urea y a la derecha los de creatinina medidos en plasma y expresados como la media \pm EEM de 7 animales de cada grupo. La figura (B) muestra la relación proteína vs. creatinina medida en orina y expresada como la media \pm EEM de 7 animales de cada grupo.

Para evaluar si existían cambios en la morfología del riñón realizamos una tinción con Tricrómico de Masson. Mediante esta técnica, no observamos lesiones ni cambios estructurales significativos en los riñones de los animales tratados con CTGF respecto a los animales control (Figura 44).

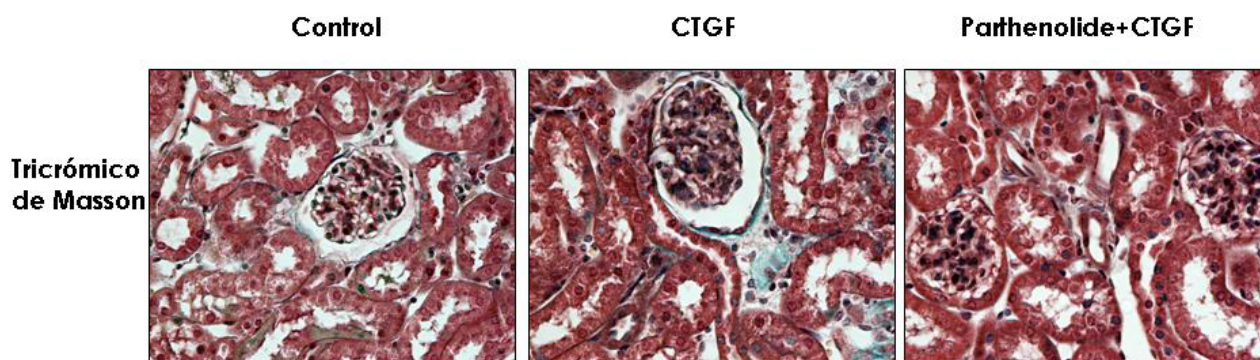


Figura 44 : Evaluación de los cambios morfológicos en los riñones de los ratones mediante Tinción de Masson. La figura muestra la Tinción de Masson de un animal representativo de cada grupo.

2. CTGF causa el infiltrado de células inflamatorias en áreas tubulointersticiales.

Como hemos demostrado en esta tesis, CTGF aparece aumentado en etapas tempranas del daño renal, al mismo tiempo que citoquinas inflamatorias y factores quimiotácticos, por lo que hemos evaluado si CTGF regula la respuesta inflamatoria renal. Tras 24 horas de administración de CTGF los ratones mostraron células con tinción positiva para CD68 (marcador de macrófagos) y CD3 (marcador de células T) en áreas tubulointersticiales (Figura 45 marcados con flechas, Figura 46: cuantificación).

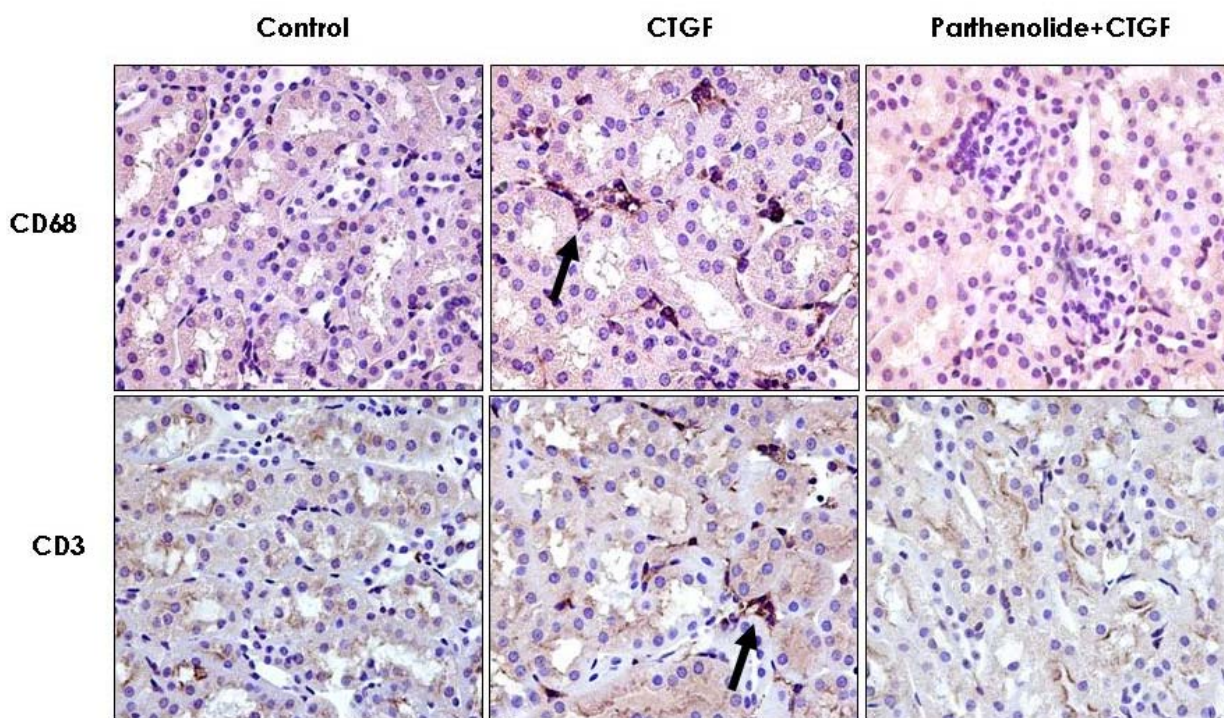


Figura 45: CTGF causa la aparición de infiltrado de células inflamatorias en el riñón. La inhibición de NFκB mejora el daño renal inducido por CTGF. La figura muestra imágenes representativas de un animal de cada grupo (n=7) de inmunotinción para CD68 (marcador de macrófagos) y CD3 (marcados de células T) realizadas en secciones de 3 μm de los riñones previamente incluidos en parafina (40x).

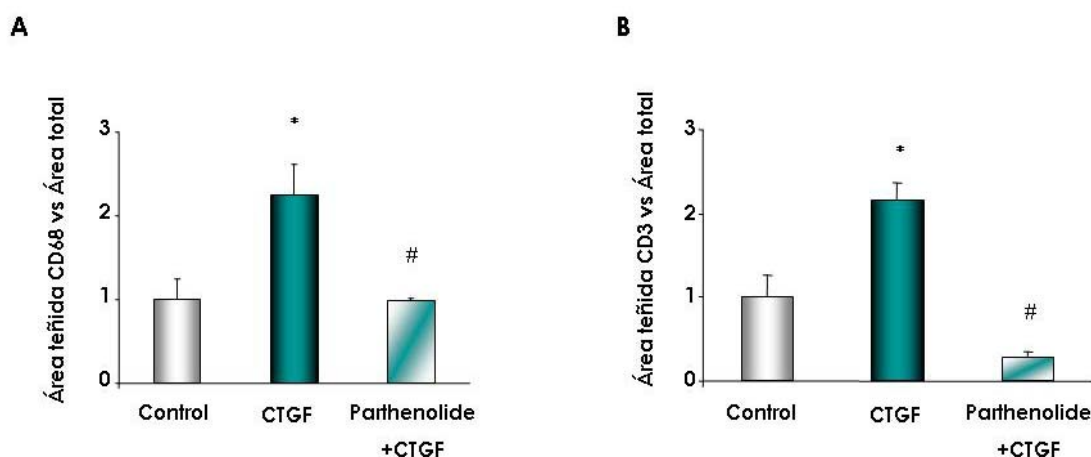


Figura 46: Cuantificación de la tinción por inmunohistoquímica para CD68 y CD3. La figura muestra la cuantificación de la tinción positiva para CD68 (A) y CD3 (B), mostrada como la relación entre el área teñida para cada marcador respecto del área total evaluada en cada muestra, y representada como la media \pm EEM de los datos obtenidos en tres mediciones independientes de 7 animales para cada grupo. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs CTGF.

3. CTGF activa la ruta de señalización de NF κ B en el riñón.

Estudios previos han demostrado que la activación del factor de transcripción NF κ B está relacionada con la respuesta inflamatoria renal^{59,133}. Para determinar si CTGF incrementa la actividad de unión al ADN de NF κ B en el riñón, extractos nucleares de tejido fueron analizados por EMSA. Los animales tratados con CTGF presentaron una mayor actividad de unión al ADN de NF κ B comparados con los del grupo control (Figura 47).

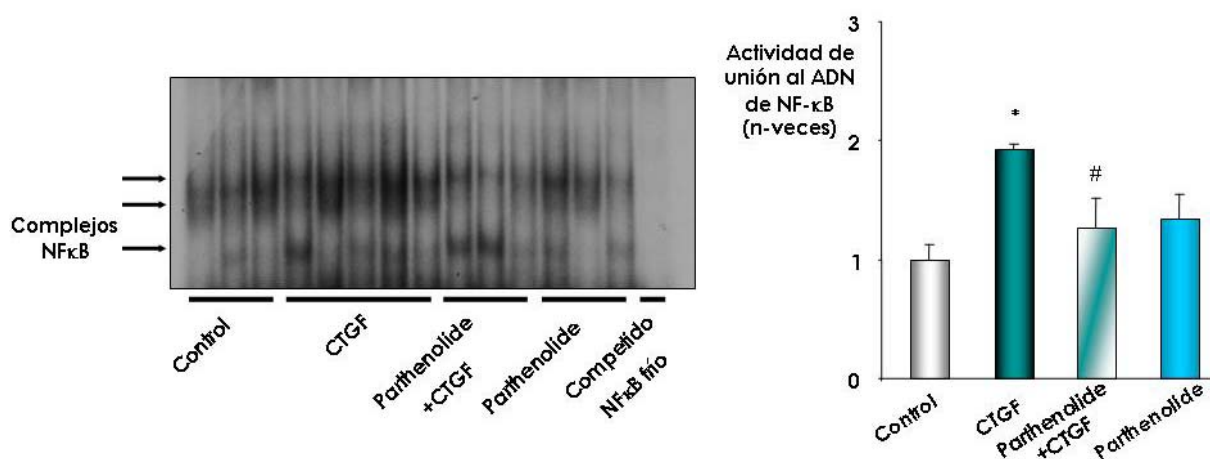


Figura 47: CTGF aumenta la actividad de unión de NF κ B al ADN en el riñón. La actividad de unión de NF κ B al ADN se evaluó por EMSA, en 30 μ g de extractos de proteínas nucleares de tejido. La figura muestra a la izquierda un gel representativo y a la derecha la cuantificación expresada como la media \pm EEM de 7 animales por grupo. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs CTGF.

4. Papel de NF κ B en la respuesta inflamatoria renal causada por CTGF.

Para evaluar la contribución de NF κ B en las respuestas de CTGF, los animales fueron pretratados con 3,5 mg/g/día de Parthenolide (inhibidor de NF κ B; inyección intraperitoneal) o su vehículo (0.05% DMSO) 24 horas antes de la inyección de CTGF. Los animales pretratados con Parthenolide previnieron el aumento en la activación nuclear de NF κ B (Figura 47) y la infiltración de

células inflamatorias (Figura 45 y 46), lo que sugiere que NF κ B es una vía de señalización importante en el reclutamiento de células inflamatorias como linfocitos T y macrófagos inducido por CTGF *in vivo*.

5. CTGF incrementa la expresión génica y la síntesis de factores quimiotácticos y citoquinas vía NF κ B en el riñón.

Diferentes factores participan en el proceso inflamatorio renal, como son citoquinas y quimioquinas liberadas por las células renales y que promueven el reclutamiento y activación de células inflamatorias. En este modelo hemos observado, la presencia de macrófagos y linfocitos T en los riñones de los animales tratados con CTGF, así como un aumento en la activación de la vía de NF κ B, uno de los principales factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo ha sido evaluar si CTGF induce la producción de quimioquinas y citoquinas inflamatorias en el riñón, y si NF κ B puede actuar como mediador de estas respuestas.

En los ratones tratados con CTGF hemos observado que la expresión génica de las quimioquinas MCP-1 (implicada en el reclutamiento de macrófagos), y RANTES (principal inductor de la infiltración de linfocitos T), estaba incrementada comparado con los animales controles (Figura 48). Los animales pretratados con el inhibidor de NF κ B (Parthenolide), presentaron niveles de expresión de MCP-1 y RANTES similares a los controles. Estos datos muestran que NF κ B participa en la regulación de quimioquinas. CTGF también aumentó la expresión de CCR2 (receptor de MCP-1), aunque en este caso no se inhibió con el tratamiento con Parthenolide (Figura 48).

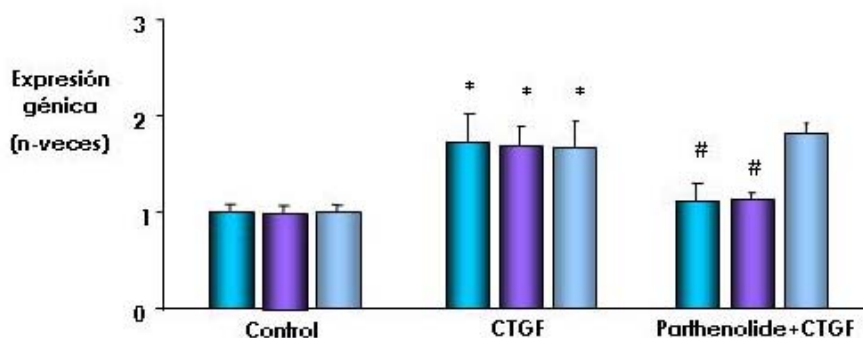


Figura 48: NF κ B modula la expresión de MCP-1 y RANTES causada por CTGF *in vivo*. La figura muestra la expresión génica de MCP-1 (■), RANTES (■) y CCR2 (■) en el riñón como la media \pm EEM de 6 animales por grupo analizado por PCR a tiempo real. Como control se utilizó 18S. * p <0.05 vs control. # p <0.05 vs CTGF.

Mediante inmunohistoquímica se observó tinción positiva para MCP-1 y RANTES en las células tubuloepteliales y en las células infiltrantes intersticiales, que disminuyó en los animales pretratados con Parthenolide, confirmando lo observado por PCR a tiempo real. (Figura 49).

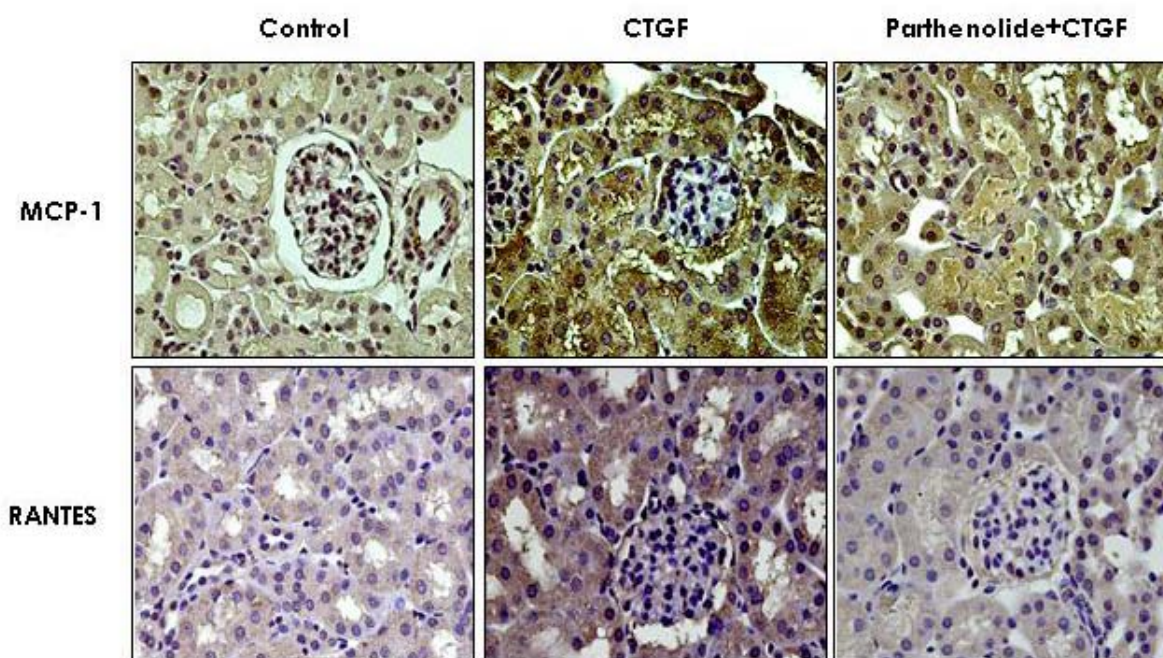


Figura 49: CTGF aumenta la producción de MCP-1 y RANTES a través de NFκB *in vivo*. En la figura se muestra inmunohistoquímica para MCP-1 y RANTES de un animal representativo de cada grupo de 6 estudiados (40x).

Como ya se ha mencionado anteriormente, durante el daño renal se produce el aumento de diversas citoquinas, las cuales contribuyen a la progresión del proceso inflamatorio. Un ejemplo es IFN- γ , el cual está implicado en el desarrollo de enfermedades renales promoviendo la acumulación de macrófagos y leucocitos, la activación de células tubuloepliales¹⁸⁶ y el aumento de la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1³³. Por su parte, IL-4 estimula la síntesis de MEC, además de inducir la liberación de factores inflamatorios como IL-6, IL-8, MCP-1 y VCAM-1^{35,61,69,72,157}. IL-6 es una citoquina multifuncional, cuya producción esta elevada en diversos tipos de daño^{115,270}. Esta citoquina estimula la expresión de factor tisular, MCP-1, enzimas degradadores de matriz extracelular y receptores de lipoproteínas de baja densidad en macrófagos^{12,87}, además de regular la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-1- β y TNF- α ¹³⁸. Hemos analizado los niveles renales de estas citoquinas relacionadas con el proceso inflamatorio mediante ELISA, observando que CTGF incrementa la producción renal de citoquinas inflamatorias como IFN- γ , IL-6 e IL-4, y que todas ellas son reguladas por NFκB (Figura 50).

También hemos analizado la producción de la citoquina IL-10, de la cual se descrito que tiene acciones anti-inflamatorias y su administración mejora el proceso inflamatorio que tiene lugar en determinadas enfermedades^{116,153}, además de ser capaz de inhibir la producción de TGF- β y por tanto la respuesta fibrótica²²⁰. Como se muestra en la figura 49, los animales tratados con CTGF presentan niveles proteicos de IL-10 por debajo de los niveles controles, sugiriendo una represión en la producción de esta citoquina. El tratamiento con Parthenolide no tuvo efecto sobre los niveles de IL-10.

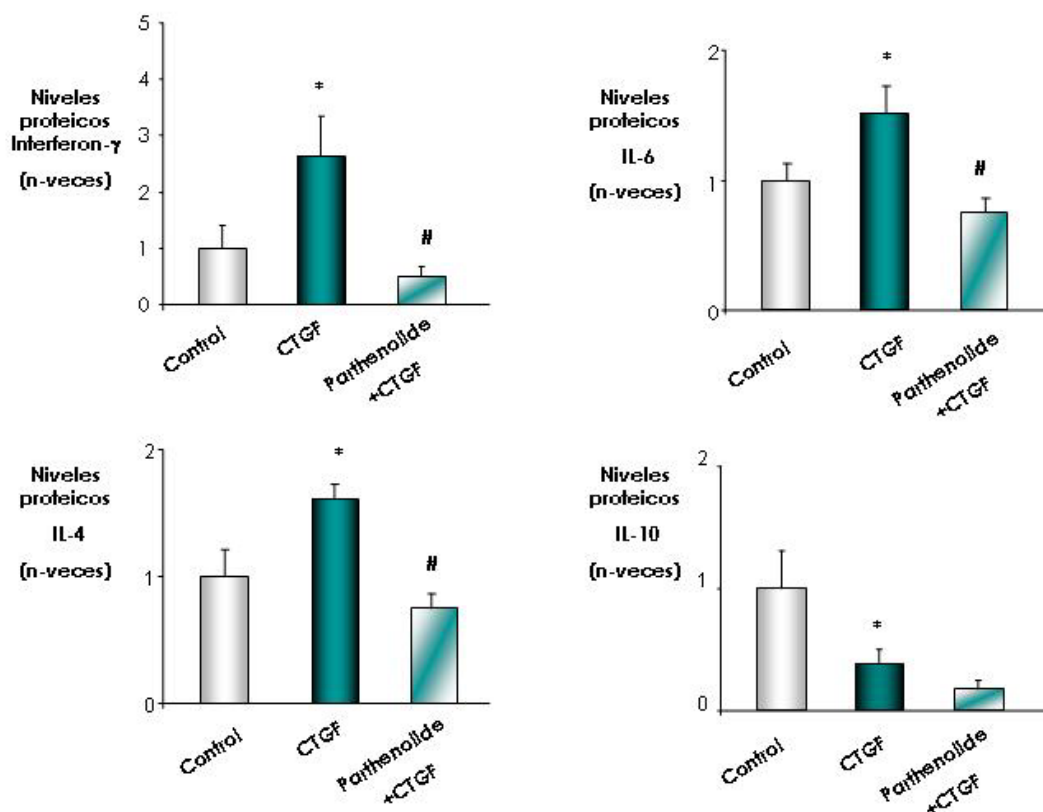


Figura 50: CTGF incrementa la producción de IFN- γ , IL-6 e IL-4 y disminuye la producción de IL-10 en el riñón. La figura muestra los niveles de proteína de IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-10 en extractos de proteínas totales del riñón de los animales estudiados. Los datos se muestran como niveles proteicos expresados como la media \pm EEM de 6 animales por grupo analizado por ELISA. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs CTGF.

Todos estos datos muestran que CTGF activa NF κ B y promueve el desarrollo de la respuesta inflamatoria al incrementar la expresión y producción de factores quimiotácticos como MCP-1 y RANTES, y citoquinas inflamatorias como IFN- γ , IL-6 e IL-4 que participan en el reclutamiento de células inflamatorias infiltrantes en áreas tubulointersticiales.

PARTE V: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO INFLAMATORIO INDUCIDO POR CTGF. ESTUDIOS *IN VITRO*.

1. CTGF activa la vía de señalización de NFκB en células tubuloepteliales murinas en cultivo (Línea MCT).

Para investigar los mecanismos intracelulares activados por CTGF, se realizaron diferentes experimentos *in vitro* en células tubuloepteliales murinas en cultivo (células MCT). Como se ha mencionado en la introducción, las células tubuloepteliales tienen gran importancia en el proceso de la respuesta inflamatoria renal²⁰⁰. Nuestro siguiente objetivo ha sido evaluar si CTGF es capaz de activar la vía de NFκB en estas células. Las células semiconfluentes fueron incubadas durante 24 horas en ausencia de suero, y tras ese tiempo se estimularon con CTGF (1-10-100 ng/mL) durante diferentes tiempos (de 15 minutos a 2 horas), y se analizó la actividad de unión de NFκB al ADN mediante ensayos de EMSA. CTGF incrementó de manera dosis dependiente (efecto máximo a 10 ng/mL) la actividad de unión de NFκB al ADN a los 15 minutos de estimulación, siendo el efecto máximo a los 30 minutos y permaneciendo elevado después de 1 hora y disminuyendo hasta los niveles controles a las 2 horas (Figura 51).

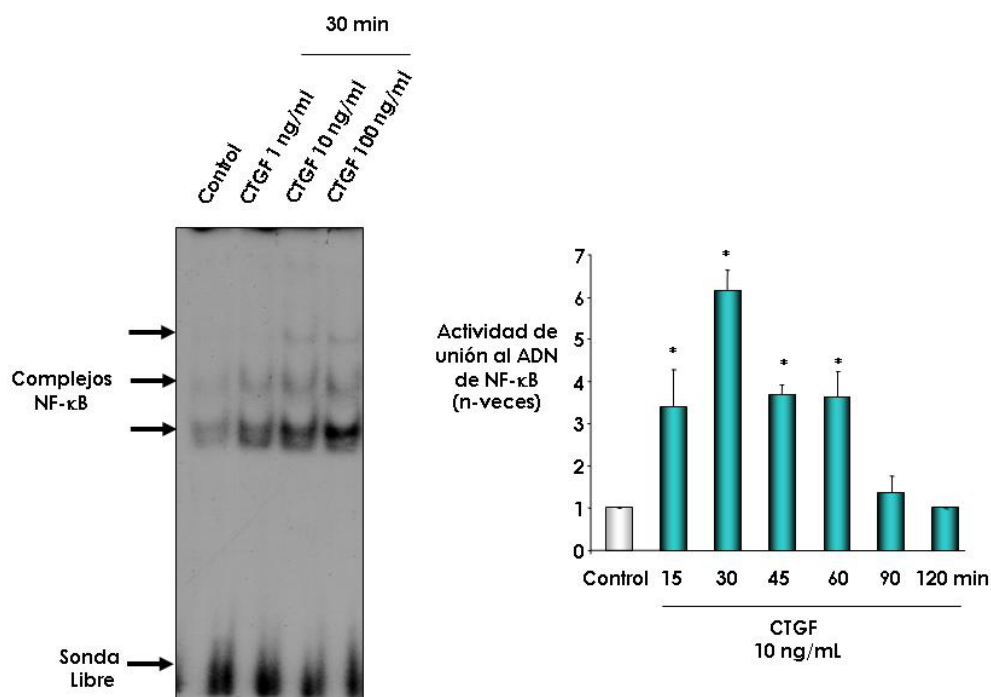


Figura 51: CTGF incrementa la actividad de unión de NFκB al ADN en células tubuloepteliales murinas (MCT). Las células fueron privadas de suero durante 24 horas y después estimuladas con CTGF recombinante (1-10-100ng/ml). El ensayo de EMSA se realizó con 10 µg de extractos de proteínas nucleares. La figura muestra a la izquierda un gel de EMSA representativo y a la derecha la cuantificación expresada como la media±EEM de 3 experimentos. Los complejos específicos de NFκB y la sonda libre se señalan con flechas, y se determinaron por estudios de competición (no mostrado). *p<0.05 vs control.

La activación de NFκB supone la degradación de la subunidad inhibitoria IκBα^{80,151}. Evaluamos los niveles de esta subunidad en los extractos citosólicos celulares mediante western blot. La estimulación

con CTGF (10 ng/mL) durante 30 minutos, tiempo en el que se observa la máxima actividad de NF κ B, disminuyó los niveles proteicos de I κ B α , sugiriendo que esta proteína está siendo degradada (Figura 52).

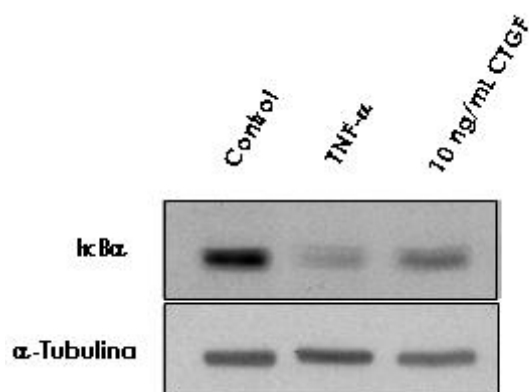


Figura 52: CTGF disminuye los niveles proteicos de la subunidad I κ B α en MCT. Las células fueron estimuladas durante 30 minutos con CTGF (10 ng/mL) y TNF- α (100ng/mL). Los niveles de I κ B α se evaluaron por western blot de extractos de proteínas citoplásmicas. La figura muestra un gel representativo de 3 experimentos realizados con resultados similares.

La activación de NF κ B supone la translocación nuclear de sus subunidades. Mediante inmunofluorescencia hemos evaluado que subunidades de NF κ B son activadas por CTGF. En las células sin estimular se observa una tinción citoplásmica difusa para p50, p65 y p52. Después de 30 minutos de estimulación con CTGF, se observa una intensa inmunotinción nuclear, mostrando que las subunidades p50, p65 y p52 se han traslocado al núcleo (Figura 53).

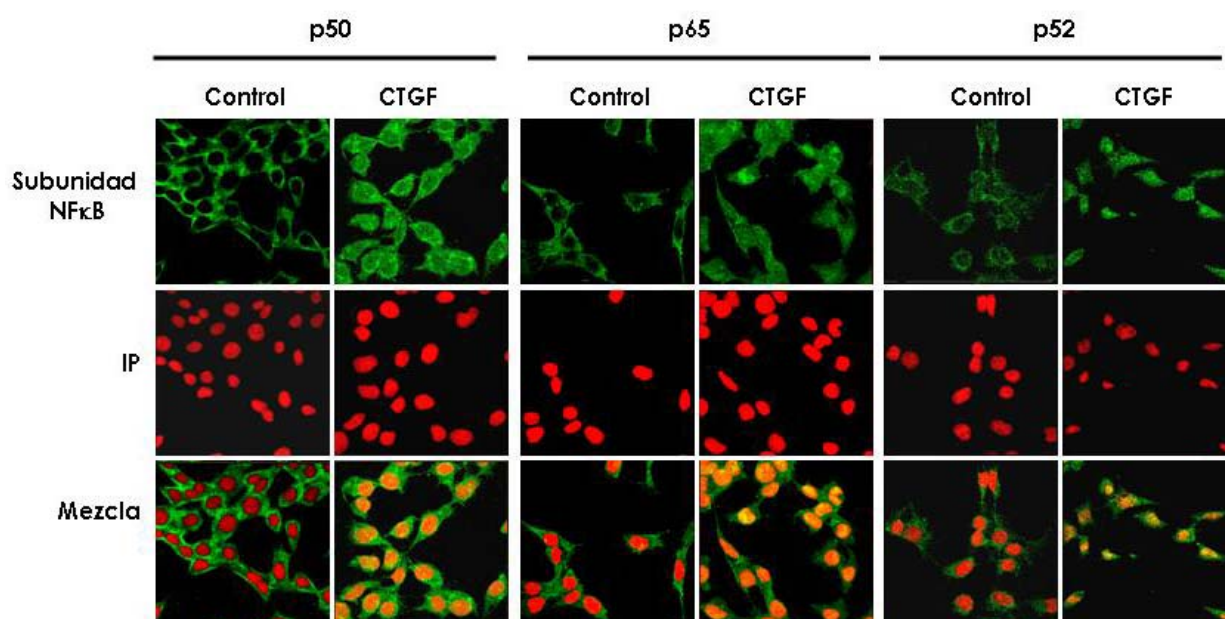


Figura 53: CTGF induce la translocación nuclear de las subunidades de NF κ B p50, p65 y p52 en MCT. Las células fueron tratadas con 10 ng/mL de CTGF durante 30 min. Se utilizaron anticuerpos primarios para p50, p65 y p52; y anticuerpos secundarios unidos a FITC (tinción verde). Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (IP, en rojo). La tinción amarilla indica la localización nuclear de las subunidades estudiadas. La figura representa imágenes de un experimento representativo de 3 realizados (para cada subunidad) para microscopía confocal.

Realizamos transfecciones transitorias en células MCT empleando un plásmido que contiene el promotor de NF κ B acoplado a luciferasa. Observamos que CTGF incrementa significativamente la actividad del promotor de NF κ B (Figura 54). Esta activación fue similar a lo observado con las citoquinas

TNF α y AngII, indicando que CTGF activa la transcripción dependiente de NF κ B en células tubuloepiteliales.

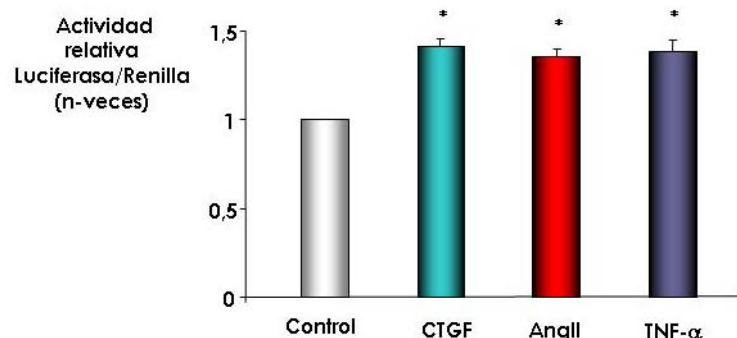


Figura 54: CTGF induce la transcripción dependiente de NF κ B en MCT. Las células fueron transfectadas de forma transitoria con el promotor de NF κ B acoplado a luciferasa. Como control interno se empleó TK-renilla. Las MCT se estimularon con 10 ng/mL de CTGF, 10⁻⁷ mol/L de AngII y 100 ng/mL de TNF- α y tras 24 horas se midió la actividad luciferasa. La figura muestra los datos como la media \pm EEM de 3 experimentos realizados. *p<0.05 vs control.

2. CTGF activa la cascada de señalización de MAPK en células tubuloepiteliales murinas en cultivo.

Para investigar los mecanismos por encima de la activación de NF κ B, hemos estudiado si CTGF regula la activación de las tres cascadas de MAPK: ERK1/2, p38 y JNK1/2. Por western blot hemos observado que CTGF incremento la fosforilación y con ello la actividad de ERK1/2 a los 20 minutos, JNK1/2 pasados 10 minutos (siendo la máxima activación a los 15); y p38 a los 20 minutos, permaneciendo elevado hasta los 30 minutos (Figura 55).

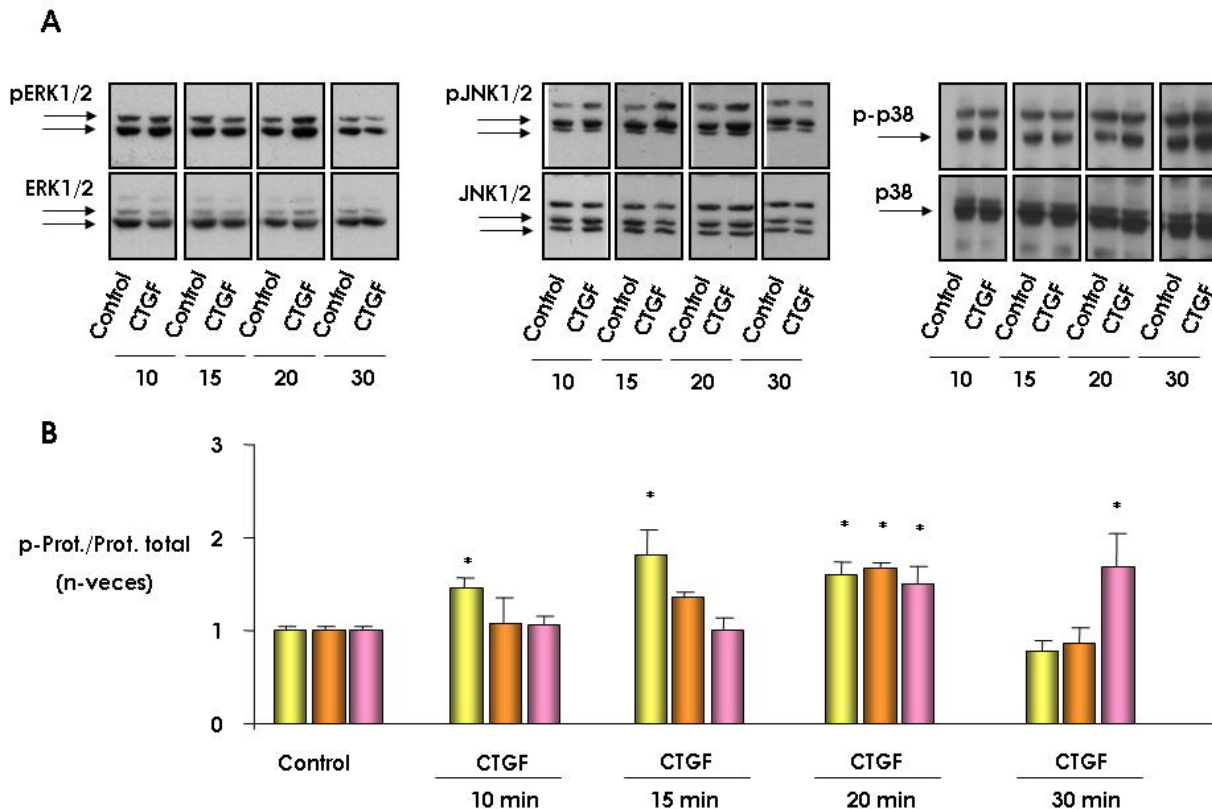


Figura 55: CTGF activa la ruta de señalización de MAPK (JNK, ERK, p38). Las células fueron estimuladas con 10 ng/mL de CTGF diferentes tiempos y los niveles de proteína se evaluaron por western blot. La figura (A) muestra geles de western blot representativos de los niveles proteicos de las quinasas fosforiladas y totales, y en la figura (B) se muestran los datos expresados como la media \pm EEM de 3 experimentos. * p<0.05 vs. control.

3. Mecanismos implicados en la activación de la vía NFκB. Papel de MAPK.

Nuestro siguiente objetivo ha sido determinar la participación de la cascada de MAPK en la activación de NFκB causada por CTGF en células tubuloepiteliales en cultivo.

Para ello hemos utilizado inhibidores específicos de las tres rutas ERK1/2 (PD98059), p38 (SB203580) y JNK (SP600125). El tratamiento con los tres inhibidores redujo la actividad de unión al ADN de NFκB (Figura 56).

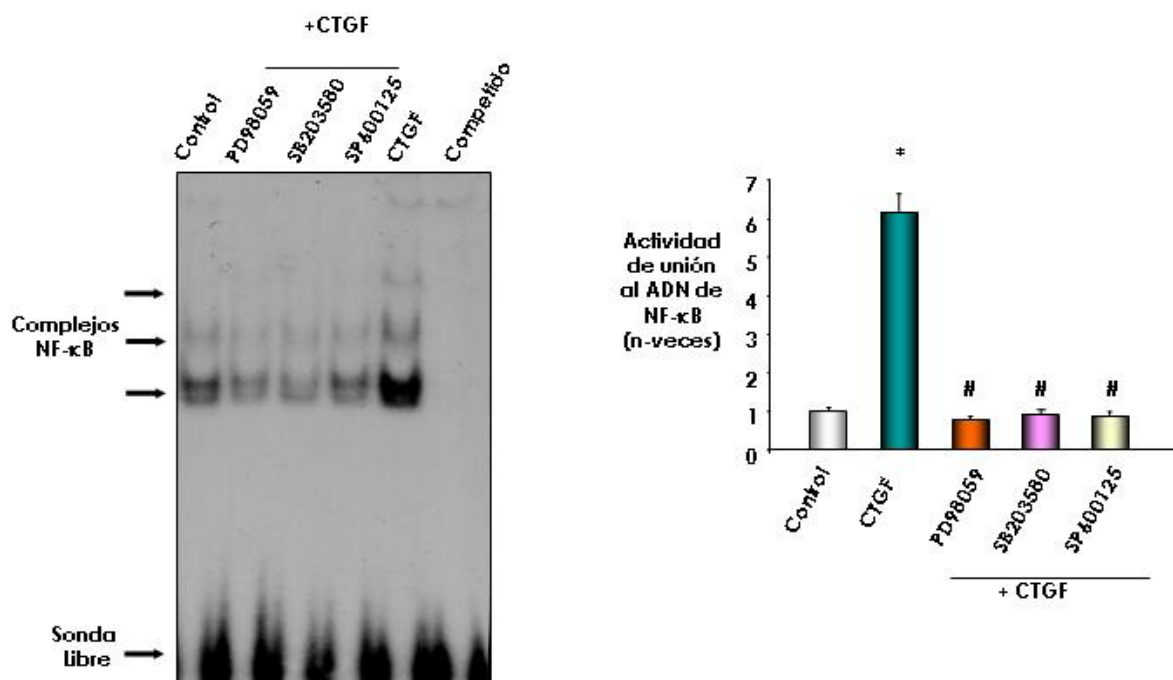


Figura 56: CTGF incrementa la activación de NFκB a través de las quinasas ERK1/2, JNK1/2, p38 en MCT. Las células fueron privadas de suero durante 24 horas y se pretrataron durante 1 hora con el inhibidor de p38 (SB203580; 10^{-5} mol/L); de ERK1/2 (PD98059; 10^{-5} mol/L); y de JNK1/2 (SP600125; 10^{-5} mol/L). Después las células se estimularon con 10 ng/mL de CTGF durante 30 min. La figura muestra a la izquierda un gel representativo de EMSA de 3 realizados y a la derecha los datos expresados como la media \pm EEM de 3 experimentos realizados. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs CTGF.

Como se muestra en la figura 57, mediante inmunofluorescencia confirmamos que tanto la quinasa ERK1/2 como p38 y JNK1/2 participan en la activación de la ruta de NFκB que causa CTGF en las células tubuloepiteliales, ya que en todos los casos la translocación al núcleo de la subunidad p65 que induce CTGF se inhibe de forma similar a lo observado con el inhibidor de la vía NFκB.

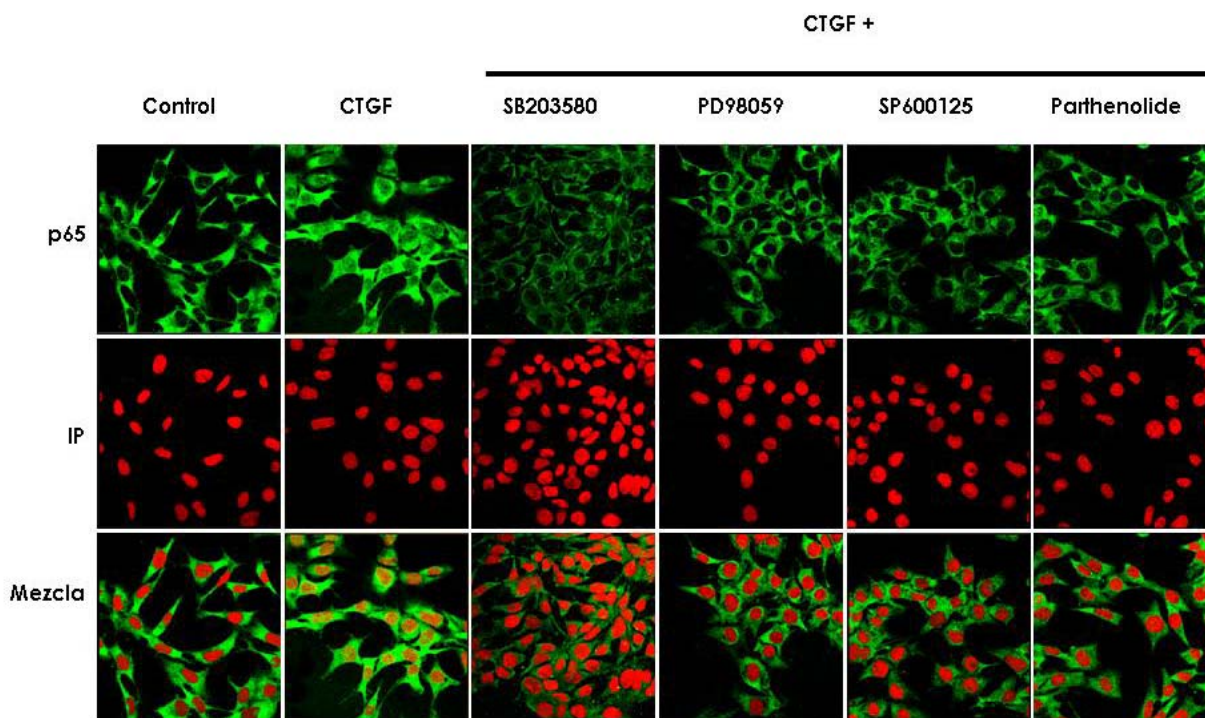


Figura 57: CTGF induce la translocación nuclear de p65 a través de las quinasas ERK1/2, JNK1/2 y p38 en MCT. Las células fueron privadas de suero durante 24 horas y se pretrataron durante 1 hora con SB203580 (inhibidor de p38: 10^{-5} mol/L); PD98059 (inhibidor de ERK1/2: 10^{-5} mol/L); SP600125 (inhibidor de JNK1/2: 10^{-5} mol/L) y como control Parthenolide (inhibidor de NF κ B: 10^{-6} mol/L). Después las células se estimularon con 10 ng/mL de CTGF durante 30 minutos. La figura muestra imágenes representativas captadas con microscopio confocal de la tinción para p65 de 3 experimentos realizados.

4. CTGF incrementa mediadores inflamatorios a través de NF κ B en células tubuloepiteliales.

Hemos investigado si CTGF regula la expresión moléculas implicadas en el proceso inflamatorio como quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión a través de la ruta de NF κ B en células MCT. Como moléculas representativas hemos elegido para el estudio MCP-1 (principal molécula quimioatrayente de macrófagos), IL-6 (citoquina inflamatoria) e ICAM-1 (molécula de adhesión que favorece la infiltración y permanencia de células inflamatorias en el riñón).

En células MCT, CTGF induce la expresión de MCP-1, IL-6 e ICAM-1 tras 6 horas de incubación (Figura 58). El tratamiento con Parthenolide redujo el aumento en la expresión de estos tres mediadores inflamatorios inducidos por CTGF (Figura 57).

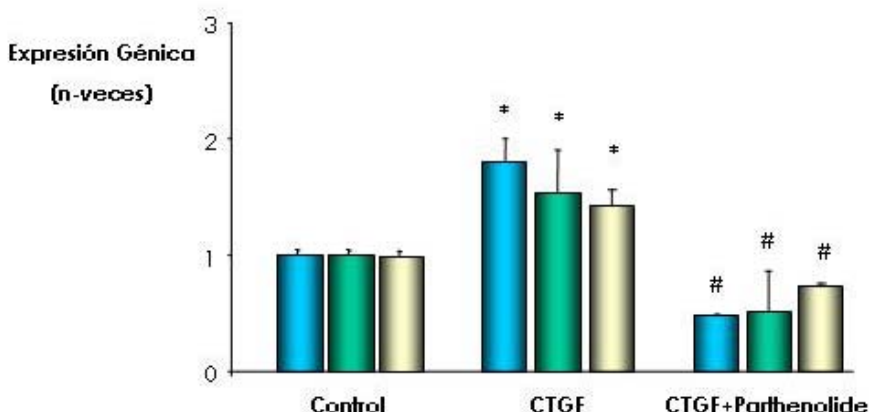


Figura 58: CTGF incrementa la expresión de factores inflamatorios en MCT. Las células se trataron con 10^{-6} mol/L de Parthenolide durante 1 hora y después fueron estimuladas con 10 ng/mL de CTGF durante 6 horas. La expresión génica fue analizada por PCR a tiempo real. La figura muestra los datos como la media \pm EEM de 4 experimentos de PCR a tiempo real para MCP-1 (■), IL-6 (■) e ICAM-1 (■). * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs CTGF.

Todos estos datos demuestran que CTGF no sólo participa en el daño renal induciendo fibrosis, sino que en las etapas iniciales del daño tienen un papel importante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. CTGF activa el factor de transcripción NF κ B, a través del cual media la producción de quimioquinas y citoquinas que favorecen el infiltrado de células inflamatorias. Además es capaz de reducir la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, promoviendo la permanencia de la respuesta inflamatoria. En la célula tubuloeptelial el aumento en la actividad de NF κ B mediado por la cascada de señalización de MAPK, induce la expresión de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión que potencian la respuesta inflamatoria (Figura 59).

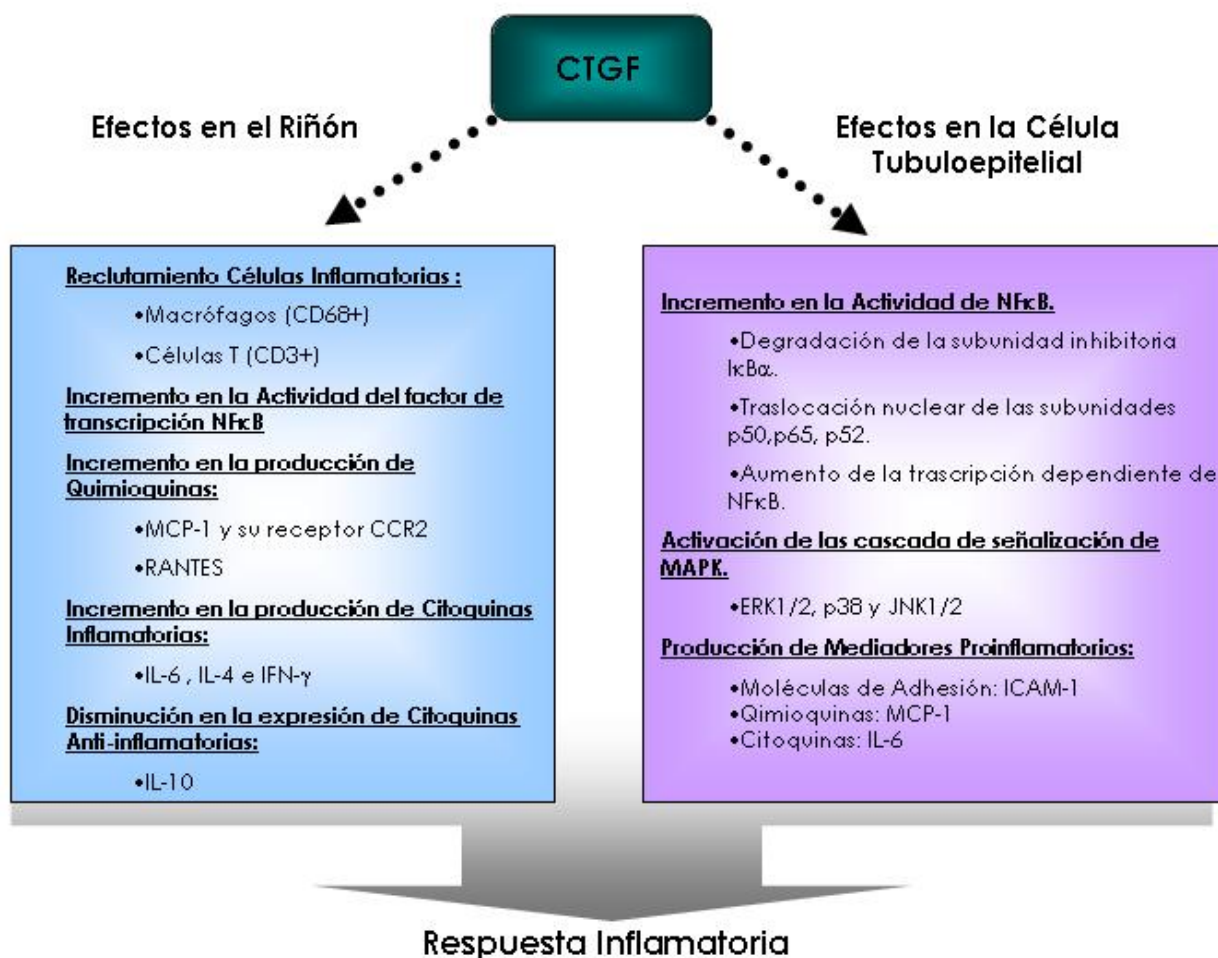


Figura 59: Esquema que refleja los efectos inflamatorios de CTGF en el riñón y en la célula tubular.

Discusión

CTGF ES UN FACTOR CLAVE EN LA PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL.

Los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que en el riñón sano el CTGF no se expresa, pero su expresión se induce en múltiples patologías renales progresivas en áreas de fibrosis^{82,321,259}. Los estudios realizados en esta tesis, utilizando un modelo experimental de daño renal inducido por infusión sistémica de AngII, muestran que CTGF se induce en etapas iniciales del daño renal, asociado a una respuesta inflamatoria, y que su expresión se mantiene elevada a lo largo del curso de la enfermedad, precediendo a la aparición de fibrosis y TEM. Estos datos sugieren que CTGF podría participar en la génesis y en la progresión de la patología renal.

1. CTGF se induce en la etapa inflamatoria del daño renal causado por AngII.

En los animales infundidos con AngII durante 3 días hemos observado la presencia de células inflamatorias a nivel glomerular e intersticial, asociado al aumento en la expresión renal de quimioquinas, como MCP-1, y citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α , factores claves en el reclutamiento de células infiltrantes y en la regulación de la respuesta inflamatoria renal. En estos animales observamos un aumento en los niveles de ARNm de CTGF en corteza renal y la inducción de la expresión de CTGF a nivel glomerular, en células mesangiales y podocitos, y en células tubuloepiteliales. Estos resultados sugieren que CTGF podría participar en la respuesta inflamatoria renal.

2. CTGF es un mediador de la fibrosis renal inducida por AngII.

La producción de CTGF renal precede en el tiempo a la acumulación de MEC, observada a la semana de infusión por aumento en el depósito de fibronectina, sugiriendo que CTGF podría ser un mediador de la fibrosis renal. El tratamiento con antagonistas del receptor AT₁ e inhibidores de la ECA^{1,2}, disminuyen la expresión renal de CTGF y la fibrosis en varios modelos experimentales de daño renal. Mediante estudios *in vitro* hemos demostrado que CTGF es un mediador de la fibrosis inducida por AngII. Estos estudios se han realizado en CM, que están implicadas en la generación y degradación de matriz extracelular y participan en la progresión del daño glomerular²²⁹. En estas células hemos observado que el tratamiento con un ODN anti-sentido de CTGF, que bloquea la síntesis endógena de CTGF, previene la producción de fibronectina y colágeno IV causada por AngII. Además, la estimulación de las CM con CTGF aumentó la producción de colágeno IV. Todos estos datos nos permiten concluir que CTGF es un mediador de la respuesta fibrótica de AngII en el riñón.

3. Relación entre CTGF y TGF- β en la regulación de la fibrosis y la transición epitelio-mesénquima (TEM).

TGF- β ha sido considerado el factor profibrótico más importante. La expresión génica renal de TGF- β también aumentó a los 3 días de infusión de AngII, permaneciendo elevada hasta las 2 semanas. TGF- β es sintetizado como una proteína inactiva, la cual es anclada a la membrana antes de su activación^{198,256}. En células en cultivo, AngII incrementa la expresión del ARNm de TGF- β , la producción de proteína y la activación de TGF- β latente, en un proceso mediado por Trombospondina-1¹⁵⁶. En las ratas infundidas con AngII durante 3 días no se observó aumento en la expresión de trombospondina-1 respecto a los animales controles³², y los niveles proteicos de TGF- β no aumentaron hasta las 2 semanas de infusión con AngII. Se ha descrito que TGF- β induce la producción de CTGF en distintos tipos celulares, donde actúa como mediador de sus acciones (fibrosis y TEM)²⁶⁹. En nefropatía diabética, se ha descrito un aumento de CTGF cuando la expansión mesangial es moderada, y aún no se observa daño intersticial y proteinuria^{188,189,264}. Sin embargo, nuestros datos indican que CTGF se induce con anterioridad al TGF- β , participando en el inicio de la fibrosis.

En varios modelos experimentales como UUO, nefritis por anticuerpos anti-Thy1, glomérulo esclerosis diabética, y como hemos observado en el modelo de infusión de AngII^{105,189,264}, TGF- β y CTGF se encuentran aumentados en etapas avanzadas de fibrosis, indicando que estos factores contribuyen a la progresión del daño renal. En el modelo de daño renal por AngII, el aumento en la expresión de CTGF se mantiene a las 2 semanas, coincidiendo con el inicio de la TEM, caracterizada por un aumento en la expresión del marcador mesenquimal α -SMA, y la disminución del marcador epitelial E-cadherina. La regulación de estos marcadores supone la transformación de las células tubuloepiteliales en miofibroblastos productores de matriz extracelular¹⁹¹. En los últimos años, han sido publicados varios trabajos que definen como mediadores de TEM diversas citoquinas y factores de crecimiento, entre los que destacan TGF- β , factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), IL-1, EGF, productos terminales de glicosilación avanzada (AGES) y AngII^{29,32,192,222,269}. CTGF actúa como mediador de la TEM causada por TGF- β , AGES y AngII^{29,32,192}. En este año se ha publicado un estudio mostrando que CTGF induce TEM en células tubuloepiteliales humanas HK-2, de manera independiente de los factores anteriormente mencionados, incrementando la expresión del marcador α -SMA y reduciendo la expresión de E-cadherina en un proceso mediado por la quinasa ligada a integrinas (ILK)¹²⁹. Todos estos datos indican que CTGF también participa en etapas avanzadas del daño renal contribuyendo a su perpetuación.

En conjunto estos resultados, indican que en las primeras etapas del daño renal inducido por AngII se induce un proceso inflamatorio, mediado por citoquinas (IL-6 y TNF- α) y quimioquinas (MCP-1). Este ambiente proinflamatorio coincide con la inducción de CTGF, sugiriendo que este factor podría participar en el proceso inflamatorio. Además hemos demostrado que CTGF es un mediador de la fibrosis renal (Figura 60).

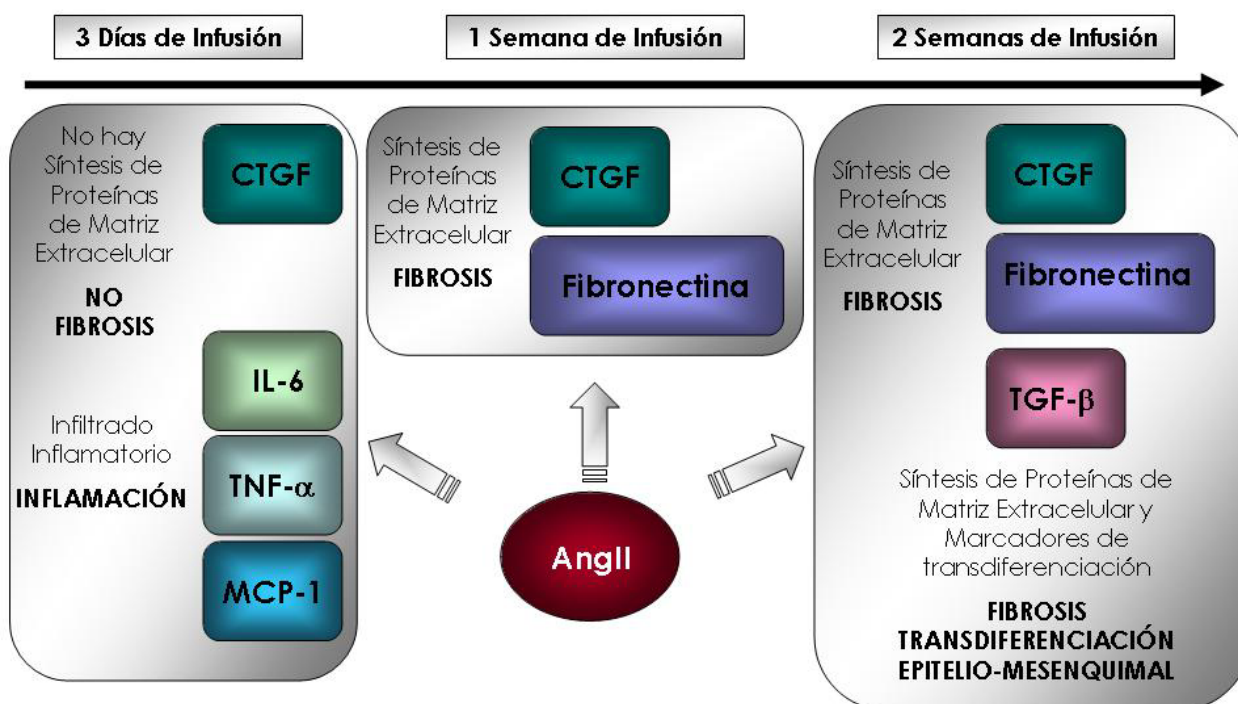


Figura 60: Expresión renal de CTGF durante el curso de la enfermedad y su correlación con otros factores implicados en la patogenia del daño renal.

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE CTGF EN CÉLULAS RENALES.

1. Vías de señalización intracelular implicadas en la regulación de CTGF.

CTGF es inducido por distintos agentes implicados en el daño renal como AngII, TGF- β , estrés mecánico y altos niveles de glucosa. En esta tesis, nos hemos centrado en los mecanismos implicados en la regulación de CTGF por AngII.

AngII actúa a través de la activación de múltiples vías de señalización intracelular entre las que podemos destacar estrés oxidativo, factores de transcripción y proteínas quinasas como MAPK, ROCK Y PI3K^{90,107,209}. En este sentido, hemos observado que en CM la producción de CTGF, causada por AngII, está mediada por la quinasa p38, ROS y ROCK⁸⁶. Sin embargo, en células tubuloepteliales humanas, línea HK-2, la regulación de CTGF por AngII se lleva a cabo a través de la activación de la

cascada de las tres MAPKs, ERK1/2, JNK1/2 y p38; así como de la ruta de ROCK (Figura 61). En fibroblastos, los inhibidores de ERK1/2 y JNK1/2, pero no p38, disminuyen la expresión de CTGF estimulada por AngII¹²⁸. Además la activación de Rho regula la expresión de CTGF causada por AngII y TGF- β en fibroblastos renales^{91,107}. La implicación de Rho en la regulación de CTGF ha sido descrito en muchos tipos celulares, incluyendo fibroblastos de pulmón y células de músculo liso vascular^{128,208}. En estas células, CTGF aumenta en respuesta a AngII a través de otras vías como ROS, las proteínas Smad y las quinasas p38, JNK1/2, ROCK, PKC y PTK^{193,210}.

Otros factores, como TGF- β , también regulan la expresión de CTGF mediante la activación de diferentes vías de señalización. Como hemos mencionado antes, en fibroblastos renales la activación de Rho media la producción de CTGF por TGF- β . Sin embargo, en células tubuloepteliales proximales y en células mesangiales este proceso esta regulado por las proteínas Smad y la cascada de señalización Ras/MEK/ERK^{41,179}. En hepatocitos, TGF- β induce la expresión y producción de CTGF y PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1), a través de ERK1/2²⁵⁰, mientras que en fibroblastos de pulmón, se trata de un proceso mediado mayoritariamente por la quinasa JNK1/2²³⁹.

En el promotor de CTGF se ha descrito un sitio de respuesta a TGF- β , de unión a Smad y regulado por AP-1¹⁹³. Además, recientemente se ha descrito que en la región proximal del promotor de CTGF existe un sitio de unión NF κ B altamente conservado³⁸. En CM y tubuloepteliales, utilizando inhibidores específicos de NF κ B, hemos demostrado que la inducción de CTGF por AngII está regulada por NF κ B (Figura 61).

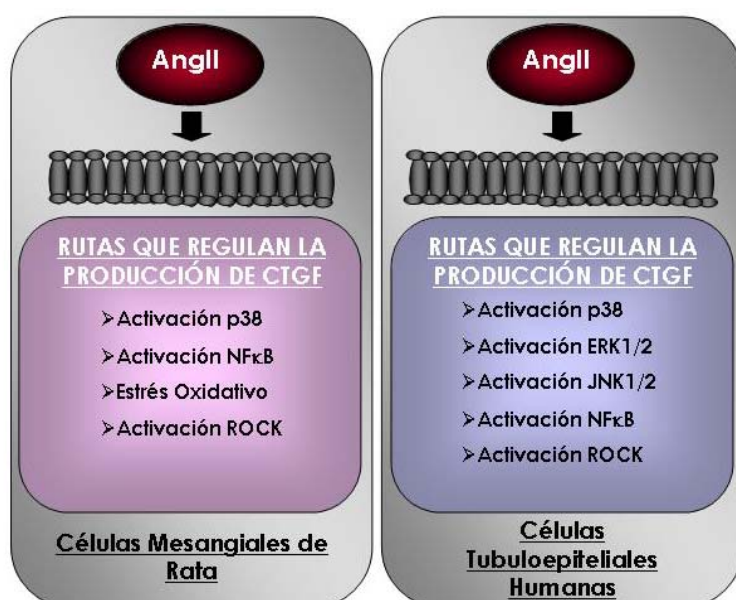


Figura 61: Esquema que representa las vías de señalización implicadas en la regulación de CTGF inducido por AngII en células mesangiales de rata y células tubulares humanas (línea HK-2) descritas en esta tesis.

Estos datos *in vitro* muestran que la regulación de CTGF supone la activación de diversas vías de señalización intracelular (como MAPK, ROCK, NF κ B y ROS), dependiendo del tipo celular y del estímulo, lo cual demuestra la gran complejidad existente en la regulación de CTGF en el riñón.

2. IL-1 β actúa como un regulador negativo de la síntesis y las respuestas celulares de CTGF en CM.

Durante el daño renal coexisten gran cantidad de moléculas que participan activamente en la progresión de la enfermedad. En esta tesis hemos planteado como hipótesis que la coexistencia de factores proinflamatorios y profibróticos podría condicionar el modo en el que el daño progresa. Por tanto, hemos evaluado el efecto de estos factores, en combinación con AngII, en la respuesta fibrótica estudiando los niveles de CTGF. En CM hemos observado que la presencia simultánea de AngII y TGF- β o IL-6 favorecen la producción de CTGF. Sin embargo, la presencia de IL-1 β inhibe la expresión y producción de CTGF causada por AngII (Figura 62)

Estudios previos han investigado la relación entre algunos de estos factores y su implicación en el daño tisular. La presencia simultánea de IL-1 β y TGF- β 1 en el entorno de la célula mesangial causa un efecto sinérgico en la producción de fibronectina, TIMP-1 y TGF- β ¹⁷⁵. En células tubulares humanas, IL-6 potencia la activación de la vía de señalización de TGF- β ²⁷⁰. Sin embargo, en células endoteliales, TGF- β reduce la expresión de VCAM-1 inducida IL-1 β ¹⁷²; mientras que en células de músculo liso vascular, otros factores de crecimiento como PDGF y EGF, potencian la activación de NF κ B causada por IL-1 β ¹¹¹. Estos estudios sugieren diferentes respuestas dependiendo del tipo celular y de la presencia mayoritaria de unos factores u otros, y nos sugieren el complejo proceso que tienen lugar durante el daño renal, en el que múltiples factores se combinan para dar lugar a unas respuestas y no a otras.

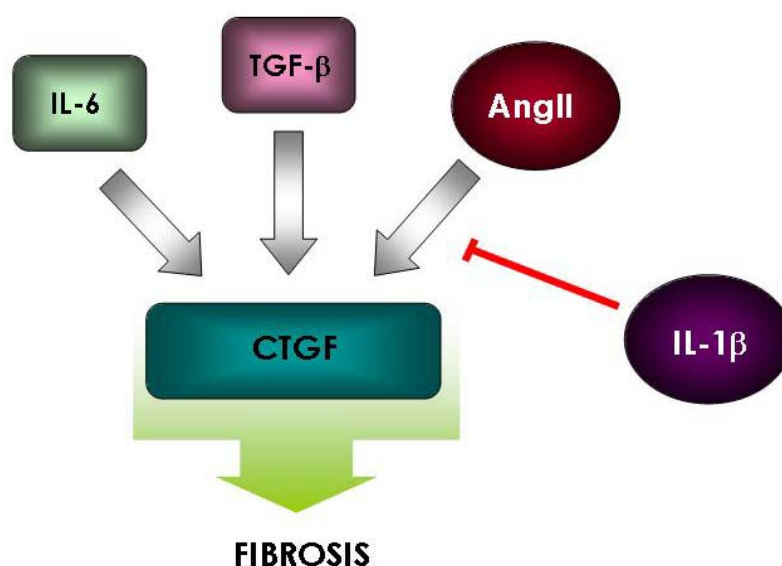


Figura 62: Esquema representativo de la regulación de CTGF por diversos factores proinflamatorios y profibróticos. Factores como AngII, TGF- β e IL-6 inducen la producción de CTGF en CM, potenciando el desarrollo del proceso fibrótico. Sin embargo, IL-1 β no solo no aumenta CTGF sino que es capaz de inhibir la producción de CTGF en respuesta a AngII.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que IL-1 β puede actuar como un modulador negativo de la fibrosis causada por AngII. Aunque el efecto *in vivo* de IL-1 β en el riñón no ha sido evaluado, varios estudios han demostrado que IL-1 β participa activamente en las etapas tempranas de la respuesta inflamatoria y, que el bloqueo del receptor de IL-1 β ejerce efectos protectores en el riñón^{236,249}. Sin embargo, el papel de IL-1 β en el daño renal crónico, y su contribución a la fibrosis aún no está claro. En la nefritis inducida por anticuerpos anti-Thy-1, el antagonismo del receptor de IL-1 β redujo la proliferación de células mesangiales y la acumulación de macrófagos a nivel glomerular, pero tuvo poco efecto sobre la acumulación de matriz extracelular glomerular²³⁴. En ratas con nefrectomía de 5/6, solamente la expresión de CTGF y TGF- β , pero no IL-1 β o TNF- α , estaba asociada con la fibrosis tubulointersticial⁶⁷. Estudios *in vitro* en células renales han demostrado diferentes repuestas dependiendo del tipo celular. En células tubuloepteliales, IL-1 β participa a través de TGF- β en la TEM y en la regulación de la matriz extracelular^{60,240}. Sin embargo, en CM, hemos observado que IL-1 β no induce CTGF ni colágeno IV, uno de los principales componentes de la matriz extracelular en el daño glomerular. Además, hemos confirmado que IL-1 β regula activamente la expresión y actividad de MMP-9^{54,55}. Estos datos sugieren que IL-1 β participa en la degradación de la matriz extracelular mesangial. En nuestras condiciones experimentales IL-1 β inhibe la respuesta fibrótica causada por AngII, bloqueando la expresión y síntesis de su principal mediador en la fibrosis, CTGF. En fibroblastos, TNF- α también suprime la expresión de CTGF causado por TGF- β y dexametasona^{1,45}, mostrando que otras citoquinas inflamatorias inhiben la expresión de CTGF en respuesta a diferentes estímulos y tipos celulares. Además, hemos observado que IL-1 β también es capaz de disminuir la expresión y producción de colágeno IV causado por AngII y CTGF indicando que IL-1 β regula CTGF a dos niveles: inhibiendo su síntesis y sus respuestas celulares.

TGF- β es un mediador de las acciones de AngII. Debido a la estrecha relación que existe entre AngII, TGF- β y CTGF, quisimos evaluar si IL-1 β es capaz de inhibir la expresión de TGF- β . Observamos que, en CM en cultivo, IL-1 β no modificó la expresión de TGF- β y trombospodina-1 (principal activador de TGF- β latente) causada por AngII, aunque si inhibió la producción de CTGF y colágeno IV. Por el contrario, IL-1 β incrementa fibronectina, TIMP-1 y TGF- β causado por TGF- β ¹⁷⁵. Estos resultados, claramente demuestran un diferente efecto regulador por parte de IL-1 β sobre la expresión de CTGF y TGF- β .

La acumulación de la matriz extracelular mesangial es el resultado de una excesiva producción de proteínas de matriz extracelular y una inhibición en su degradación. En CM, hemos observado que la presencia simultanea de AngII e IL-1 β causa un efecto sinérgico en la expresión génica y la actividad de MMP-9 indicando un entorno degradador de matriz extracelular. El aumento en la actividad de la MMP-9 por la coincubación de IL-1 β y AngII es responsable en parte de la degradación de colágeno IV, como se demuestra por la correlación temporal de la regulación de ambas proteínas y por el efecto del inhibidor de MMP-9 en los niveles de colágeno IV (tanto soluble como asociado a la célula).

Los mecanismos responsables de la acumulación de MEC no se conocen por completo. En los procesos de cicatrización de heridas, se produce una elevada síntesis de matriz extracelular atribuible a la activación de las células residentes por citoquinas y factores de crecimiento hasta que el daño es reparado. Cuando la activación es persistente y permanece de forma incontrolada, la acumulación de matriz extracelular es intensa, dando lugar a la fibrosis patológica. Los mecanismos de reparación y daño tisular aún no se conocen con exactitud. Nuestros hallazgos *in vitro* en CM muestran que IL-1 β actúa como un regulador negativo de la acumulación de colágeno IV causado por AngII, por un mecanismo que implica su supresión, al inhibir la síntesis de CTGF, y un aumento en su degradación al incrementar la actividad de MMP-9. Aunque el significado biológico de estos resultados *in vitro* en la patología renal no ha sido aclarado en esta tesis, nuestros datos muestran un nuevo mecanismo implicado en la regulación de la matriz extracelular mesangial que podría contribuir al mantenimiento de la homeostasis tisular o a la regulación del acumulo de matriz. En este sentido, ha sido descrito que IL-1 participa en el fin de la cicatrización de la herida en queratinocitos a través de la inhibición de CTGF¹⁶⁸.

Entre las múltiples vías de señalización implicadas en el daño renal, hemos detectado que la quinasa ERK1/2 parece ser la principal mediadora del efecto inhibitorio de IL-1 β sobre las respuestas de AngII. Así, un inhibidor específico de la ruta de ERK1/2, pero no de las quinasas p38, JNK1/2, PI3K/Akt o ROCK, revirtió el efecto mediado por IL-1 β sobre CTGF, colágeno IV y MMP-9. Por el contrario, la activación de p38 por la AngII es necesaria para la producción de CTGF y colágeno IV, como previamente se había descrito para TGF- β ¹⁵⁶. Estos datos muestran la complejidad de las vías intracelulares implicadas en la regulación de los mediadores profibróticos y componentes de la matriz extracelular. Varios modelos experimentales han demostrado que el bloqueo farmacológico de las rutas ERK1/2 y p38 previenen el daño renal mediado por AngII¹⁹. Futuros estudios son necesarios para conocer si la modulación de las quinasas ERK1/2 y p38 podrían ser importantes dianas para el tratamiento de la fibrosis renal.

Durante el daño renal tiene lugar la regulación de citoquinas y factores de crecimiento, con elevadas concentraciones locales dependiendo de las estructuras renales y la progresión de la enfermedad^{48,200,234,269}. Nuestros estudios *in vitro* muestran que IL-1 β puede antagonizar la respuesta fibrótica de AngII cuando ambas citoquinas coexisten en el entorno glomerular. Estos resultados son fruto de estudios *in vitro*, y por tanto, no reflejan necesariamente las condiciones en el tejido fibrótico *in vivo*, donde otras citoquinas podrían también participar en la regulación de la matriz extracelular. En este sentido, en el modelo de infusión de AngII hemos observado que los niveles de IL-1 β no están aumentados a los tres días, lo que sugiere que esta citoquina no participa en la respuesta inflamatoria renal de AngII. En condiciones patológicas, el balance entre los mediadores fibróticos y los anti-fibróticos, podría finalmente decidir si las células toman parte en la acumulación excesiva de matriz extracelular o si por el contrario actúan en el proceso de remodelación del tejido de forma normal (resolución). La complejidad de las respuestas inducidas por factores de crecimiento y citoquinas, así como los diferentes efectos por sus combinaciones, parecen indicar que son necesarios estudios en pacientes con diferentes patologías renales progresivas y no progresivas que evalúen niveles renales de

una larga lista de citoquinas, así como su correlación con la progresión de la enfermedad, para poder explicar porqué y cómo progresa el daño renal.

En resumen, en esta tesis hemos demostrado que en CM, la citoquina proinflamatoria IL-1 β inhibe la producción de CTGF inducida por AngII y ejerce un efecto inhibitorio en la acumulación de matriz extracelular causada por AngII. Este efecto inhibitorio de IL-1 β está principalmente mediado por la cascada ERK1/2 (Figura 63). Estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos implicados en la regulación de la homeostasis tisular y la acumulación de MEC.

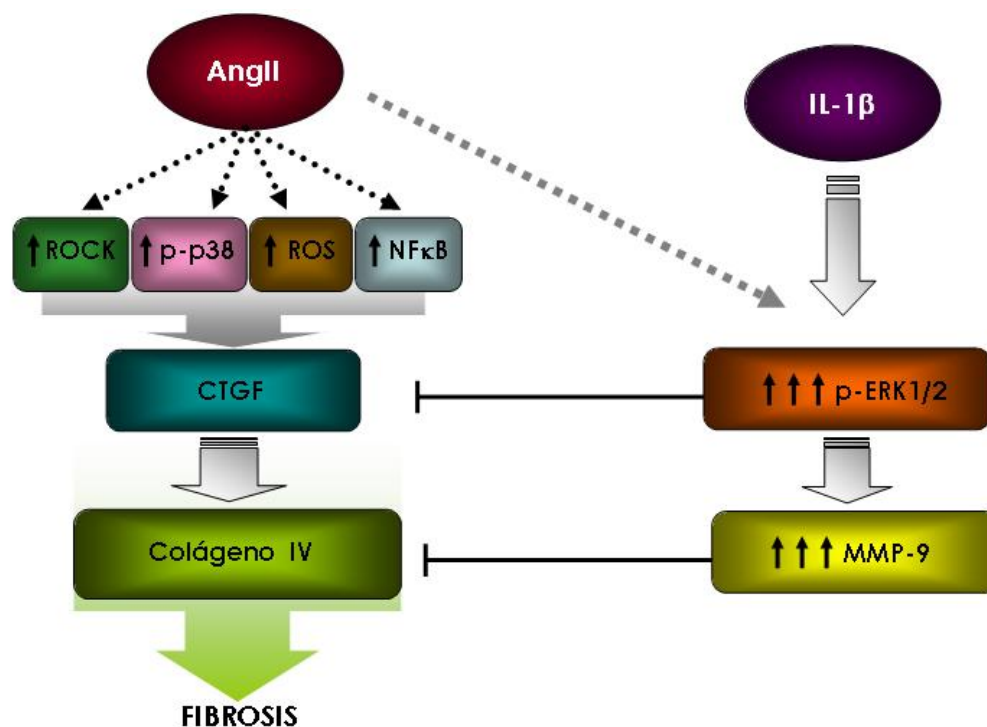


Figura 63: Esquema representativo del mecanismo por el cual IL-1 β ejerce su efecto inhibitorio sobre CTGF y colágeno IV.

PAPEL DE CTGF EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL.

CTGF es un factor con propiedades multifuncionales como proliferación, migración, angiogenesis, apoptosis, supervivencia, diferenciación, hipertrofia y TEM^{29,74,106,147,160,233,241,262,269}. Existen algunas evidencias que sugieren que CTGF puede desempeñar un papel importante en el daño renal más allá de potenciar la síntesis de proteínas de matriz extracelular. Respecto a este punto, hemos investigado el papel potencial de CTGF, clásico factor profibrótico, en el proceso inflamatorio.

1. CTGF induce el reclutamiento de células inflamatorias infiltrantes en el riñón.

En esta tesis, hemos observado que la administración sistémica de CTGF en ratón indujo la presencia de células inflamatorias en zonas tubulointersticiales, concretamente localizamos macrófagos (células CD68 positivas), y células T (células CD3 positivas). Estos animales no presentaron cambios en la función renal ni daño tubular o fibrosis. Estos datos, son la primera evidencia que demuestra que CTGF contribuye a la inflamación renal *in vivo*.

2. CTGF activa la vía de señalización de NFκB en el riñón.

Entre los mecanismos de señalización implicados en la respuesta inflamatoria e inmune, el factor NFκB tiene un especial interés^{50,113,143,180,205,237,265}. NFκB es un factor de transcripción que regula la expresión de mediadores inflamatorios, como quimioquinas y citoquinas, que contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias en el riñón¹⁹⁹. Nuestros datos muestran que la administración sistémica de CTGF activó el factor NFκB en el riñón correlacionado con la presencia de células inflamatorias infiltrantes. Además el bloqueo de NFκB, utilizando Parthenolide, inhibió el infiltrado inflamatorio intersticial causado por CTGF. La contribución de NFκB en las enfermedades renales experimentales y humanas ha sido descrita previamente^{59,133,185}, pero esta es la primera vez que se define como una vía de señalización implicada en las acciones inflamatorias de CTGF *in vivo*.

3.- CTGF induce la producción de quimioquinas y citoquinas in vivo a través de la ruta de NFκB.

Los animales tratados con CTGF presentaron niveles renales aumentados de quimioquinas como MCP-1 y RANTES, factores que participan activamente en el reclutamiento de subpoblaciones de células inflamatorias al interior de los tejidos, durante el proceso inflamatorio. MCP-1 desempeña un papel importante en el reclutamiento de monocitos/macrófagos, y contribuye significativamente al incremento en la producción de RANTES (quimioquina clásicamente atrayente y secretada por linfocitos T)⁸³. El bloqueo de la función de MCP-1 y RANTES en un modelo de glomerulonefritis crescente disminuyó la proteinuria así como el número de leucocitos infiltrantes, indicando que ambas quimioquinas juegan un papel importante en la fase inflamatoria de esta enfermedad¹³⁴. Además, en este mismo estudio, el

bloqueo de MCP-1, redujo la acumulación de colágeno I demostrando la implicación de esta quimioquina en la patogénesis de las lesiones glomerulares progresivas y tubulointersticiales¹³⁴. En biopsias humanas de pacientes con nefropatía diabética y en modelos de daño renal experimentales se ha determinado una correlación entre la activación de NFκB y la expresión elevada de quimioquinas^{148,199,200}, tal y como hemos observado en nuestro modelo en los animales tratados con CTGF. Además el tratamiento con Parthenolide, inhibió la activación de NFκB y el aumento en la expresión y síntesis de quimioquinas causadas por CTGF *in vivo*, mostrando que la vía de señalización de NFκB esta implicada en la regulación de quimioquinas y en el reclutamiento de células infiltrantes causados por CTGF en el riñón (Figura 64).

Las células Th1 secretan un conjunto de citoquinas característico, entre las que encontramos IL-2, IL-12, IL-18, IFN-γ y CD40L, que potencian la inmunidad mediada por células y la inflamación dependiente de fagocitos, y que desempeñan un papel importante en la perpetuación de los procesos de inflamación local en el riñón debida a la activación de monocitos/macrófagos y células renales residentes²³⁸. En cambio, las células Th2, secretan citoquinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, y IL-13, que producen una respuesta mediada por anticuerpos (incluyendo la clase IgE en la respuesta alérgica) y la acumulación de eosinófilos, pero que inhibe las funciones de las células fagocíticas. El balance entre citoquinas Th1/Th2 determina la evolución del daño²³⁸.

En nuestro modelo, los ratones tratados con CTGF presentaron una elevada producción renal de IFN-γ, IL-4 e IL-6, citoquinas relacionadas con ambos tipos de respuesta inmune e inflamatoria. En este sentido, IFN-γ está implicada en el desarrollo de las enfermedades renales actuando como un potente inductor del factor inhibidor de la migración de macrófagos, promoviendo la acumulación de macrófagos, leucocitos y células tubuloepteliales durante el proceso inflamatorio en el riñón¹⁸⁶. Además, la secreción de IFN-γ hace que aumente la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 que favorecen el reclutamiento de macrófagos y la progresión de la enfermedad³³. Por su parte, IL-4 estimula la síntesis de MEC en células epiteliales y mesangiales, además de inducir la liberación de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-8 y MCP-1, colágeno III y VCAM-1 en células endoteliales vasculares^{35,69,72,98,157}. IL-4 actúa en muchos casos potenciando las acciones de otras citoquinas. IL-4 incrementa la producción de RANTES inducida por CD40 y citoquinas en células tubuloepteliales humanas sugiriendo que el contacto directo entre células Th2 activadas y las células tubuloepteliales puede amplificar la reacción inflamatoria local en el riñón⁴⁷. En células mesangiales humanas, IL-4 en presencia de estímulos activadores de NFκB como IL-1β, puede contribuir a potenciar la expresión de moléculas relacionadas con la inflamación en el daño glomerular¹⁵⁸. Además de sus acciones inflamatorias, IL-4 causa proliferación de células de músculo liso bronquial²⁰, fibroblastos humanos en cultivo⁶¹ y células mesangiales y miofibroblastos²²⁵. Por último, IL-6 es una citoquina multifuncional que activa el factor de transcripción STAT3, PI3K/Akt y NFκB, y estimula la expresión de factor tisular, MCP-1, enzimas degradadores de matriz extracelular y receptores de lipoproteínas de baja densidad en macrófagos^{12,87,115,126,270}. IL-6 causa agregación plaquetaria y proliferación¹⁰³ y regula la expresión de citoquinas inflamatorias como IL1-β y TNF-α¹³⁸. En células mesangiales, IL-6 regula la proliferación

celular¹⁵², y en células tubulares humanas, IL-6 potencia la señalización de TGF- β ²⁷⁰. En un modelo de daño renal por isquemia/reperfusión se ha observado que la presencia de IL-6 endógena incrementa el grado de la lesión, la disfunción renal, la inflamación, y la producción de moléculas de adhesión y estrés oxidativo¹⁷³.

Todos estos datos muestran que CTGF, a través de la regulación en la síntesis de IFN- γ , IL-4 e IL-6 participan en la respuesta inflamatoria renal. Además hemos observado que los ratones pretratados con Parthenolide mostraron niveles de estas citoquinas similares a los animales controles, indicando que NF κ B regula su inducción causada por CTGF (Figura 64).

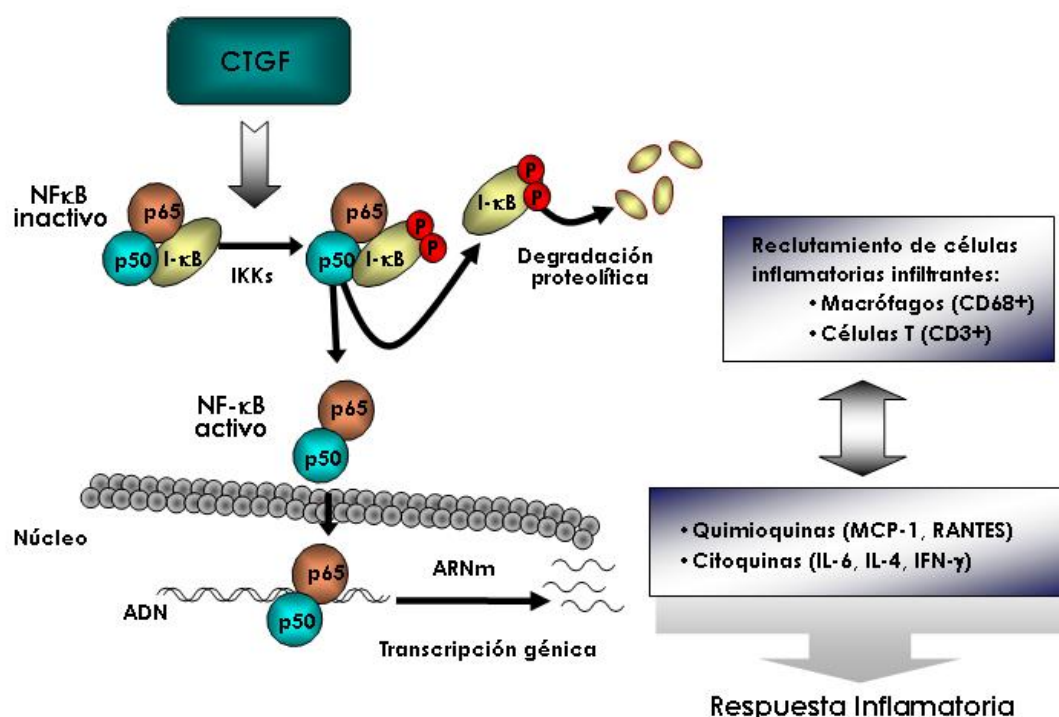


Figura 64: Esquema representativo de la activación de la respuesta inflamatoria de CTGF en riñón.

Por último, hemos evaluado los niveles de IL-10, una potente citoquina anti-inflamatoria que actúa principalmente sobre las células presentadoras de antígenos como los macrófagos. IL-10 es capaz de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e INF- γ , algunas quimioquinas y factores de crecimiento limitando así el daño tisular^{3,13,64,117,182,213,218}. Estas propiedades anti-inflamatorias se deben en parte a la inhibición de NF κ B, ya que IL-10 inhibe la translocación nuclear del homodímero supresor p50/p50, los cuales compiten con el heterodímero p65/p50 por los sitios de unión al ADN en genes inflamatorios como IL-6 y MIP-2 α , y también inhibe la actividad de IKK impidiendo la degradación de la subunidad inhibidora I κ B α ^{7,218}. Ha sido demostrado que IL-10 endógena ejerce un papel protector en el desarrollo de la glomerulonefritis creciente, reduciendo la inflamación y la proliferación mesangial¹¹⁶, y suprime la formación de glomérulo esclerosis en ratas FGS/kilt que desarrollan de forma espontánea glomérulo esclerosis segmental focal⁴⁴. En un modelo de fibrosis

hepática en ratas, se ha descrito que el tratamiento con IL-10 inhibe la expresión de TGF- β sugiriendo un posible papel anti-fibrótico para IL-10²¹⁰. En un modelo de daño vascular directo, IL-10 disminuyó la expresión del factor de transcripción NF κ B, MCP-1 y bFGF²⁷⁴. El tratamiento con IL-10 retarda la progresión del daño renal en un modelo de daño renal crónico, efecto que puede ser mediado por la supresión de quimioquinas y la reducción de células inflamatorias infiltrantes, resultando en una respuesta fibrótica atenuada¹⁵³. En nuestro modelo, los ratones tratados con CTGF mostraron una disminución significativa en los niveles proteicos de IL-10 respecto a los animales controles, lo que nos indica que la capacidad inflamatoria de CTGF no solo se limita al aumento de factores inflamatorios que contribuyen al daño sino también a la reducción de factores protectores, como es el caso de IL-10.

4. CTGF induce la expresión de mediadores inflamatorios a través de NF κ B en células tubuloepiteliales.

En células tubuloepiteliales murinas, hemos evaluado las vías de señalización intracelulares activadas por CTGF y su implicación en las respuestas inducidas por este factor. Las células tubuloepiteliales tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria renal²⁰⁰. Durante el daño renal, estas células se activan y sintetizan factores proinflamatorios que contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que CTGF activa la vía clásica de NF κ B en células tubuloepiteliales. CTGF incrementa la actividad de unión de NF κ B al ADN de manera rápida, a tan sólo 30 minutos después de la estimulación, disminuyendo hasta los niveles controles a las 2 horas. NF κ B se encuentra en el citoplasma, en condiciones control, asociado a la subunidad inhibitoria I κ B^{22,80}. CTGF induce la disociación del complejo y la degradación de la subunidad inhibitoria I κ B α , lo que supone la liberación de los complejos NF κ B activos (heterodímero p50/p65) y su consecuente translocación al núcleo, donde tras unirse a secuencias específicas de ADN incrementa la transcripción génica dependiente de NF κ B, como hemos observado mediante transfecciones transitorias con un plásmido reportero que contiene sitios de unión al promotor de NF κ B. Como consecuencia se induce la transcripción de diferentes genes diana regulados por NF κ B e implicados en la respuesta inflamatoria como quimioquinas (MCP-1), citoquinas (IL-6) y moléculas de adhesión (ICAM-1). Coincidiendo con nuestros resultados, se ha descrito recientemente en células hepáticas y en células mesangiales, que CTGF induce la activación de la ruta clásica de NF κ B^{74,257}. Además, debemos considerar que CTGF activa esta vía muy rápidamente, tan solo a los 15 minutos de estimulación con CTGF ya observamos un aumento en la actividad de unión de NF κ B al ADN, respuesta comparable a lo observado con conocidos factores inductores de inflamación a través de la ruta de NF κ B, como AngII y TNF- α . Estos datos sugieren que CTGF tiene un importante papel en la respuesta inflamatoria en estas células.

En células tubuloepiteliales observamos que CTGF induce la translocación nuclear de la subunidad p52, la cual forma parte de la vía alternativa de activación de NF κ B. Esta vía ha sido descrita recientemente por estar relacionada con la inducción de la transcripción de genes implicados en la apoptosis²²⁴. Hemos observado, en resultados preliminares no mostrados en esta tesis, que CTGF induce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, y que parece proteger frente a la apoptosis en células tubuloepiteliales. Sin embargo, en células mesoteliales CTGF media la apoptosis inducida por TGF- β ²³³, y en células de músculo liso aórtico, CTGF también induce apoptosis⁹². En este último caso, las dosis de CTGF que inducen apoptosis, 5 y 10 mg/mL, son muy superiores a las empleadas en esta tesis (10 ng/mL), lo que sugiere que este efecto sea dependiente de la dosis empleada además del tipo celular. Todos estos resultados sugieren que CTGF podría participar en la apoptosis renal, indicando que son necesarios estudios en más profundidad.

En esta tesis hemos evaluado los mecanismos implicados en la regulación de la activación de la ruta NF κ B por CTGF. En células tubuloepiteliales, hemos demostrado que CTGF es capaz de inducir la fosforilación de las quinasas ERK1/2, p38 y JNK1/2, y por tanto activar estas tres rutas de señalización (Figura 65). La vía de señalización intracelular de MAPK participa en la regulación de algunas respuestas de CTGF en diferentes células. En células HK-2, CTGF induce la expresión de ILK a través de la activación de ERK1/2^{70,132}. En células mesangiales humanas ERK1/2 media la respuesta fibrótica inducida por CTGF (producción de fibronectina), la migración celular, la reorganización del citoesqueleto^{36,70}, y la secreción de fractalkina (proteína quimiotáctica)²⁵⁸. CTGF, a través de MAPK, regula diferencialmente diversos procesos en condrocitos, como el crecimiento a través de la activación de JNK1/2²⁶⁶; la proliferación celular a través de ERK1/2 y la diferenciación regulada por p38²⁶⁷.

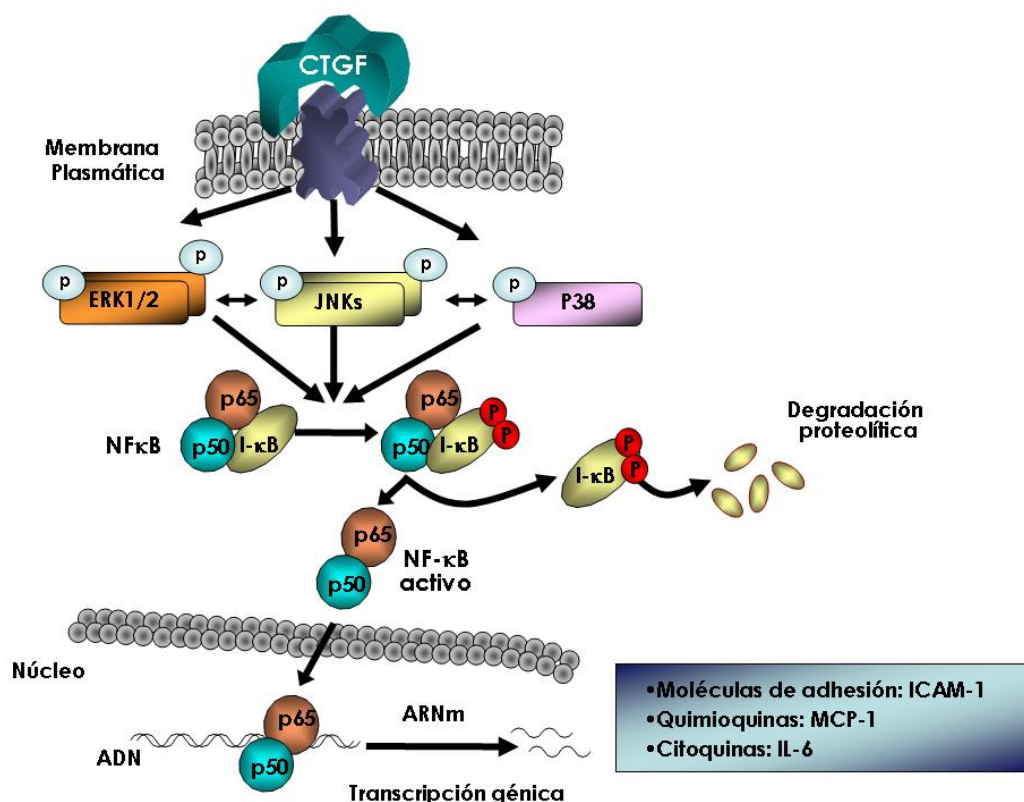


Figura 65: Mecanismo propuesto para la respuesta inflamatoria causada por CTGF.

Estudios previos han demostrado la relación entre las rutas de señalización de proteínas quinasas y la vía del factor NFκB. En células mesangiales, CTGF induce la activación de NFκB a través de la activación de la quinasa PI3K/Akt²⁵⁷. Nuestros datos muestran que en células tubuloepteliales murinas, el tratamiento con inhibidores de las cascadas de señalización ERK1/2, p38 y JNK1/2 inhibió la translocación nuclear de la subunidad p65 (subunidad implicada en la activación de la transcripción dependiente de NFκB) y la actividad de unión al ADN, mostrando que las tres quinasas participan en la activación de la ruta de NFκB inducida por CTGF (Figura 65).

Algunos estudios sugieren que la capacidad de CTGF de inducir múltiples funciones se debe en gran parte a la diferente forma en la que sus dominios interaccionan con otras moléculas. Estudios realizados en células endoteliales vasculares obtenidas de cordón umbilical humano, mostraron que los dominios del factor Von Willebrand tipo C, de trombospondina-1 y el dominio C-terminal, así como la estructura completa de los cuatro dominios de CTGF, activan la cascada de señalización de ERK, mientras que el dominio de proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) no es capaz de activar esta quinasa. Sin embargo, este módulo IGFBP activa JNK en condrocitos humanos; y la activación de p38 requiere en estas células la combinación de los cuatro dominios¹²⁰. Todos estos datos muestran la complejidad en la modulación de las respuestas celulares causadas por CTGF, indicando que una posible modulación terapéutica de las vías de señalización implicadas en sus respuestas quizá no sea la alternativa más efectiva en la inhibición de sus acciones.

Como hemos mencionado en la introducción no existen receptores conocidos para CTGF, aunque se ha descrito que su interacción con determinadas integrinas, proteoglicanos heparan sulfato, proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, así como la activación de receptores tirosina quinasa permiten la transducción de sus señales celulares. A este respecto CTGF es capaz de interaccionar con diversas proteínas como fibronectina^{42,68} y TGF-β², lo que le permite desarrollar procesos como la adhesión celular y la organización de la matriz extracelular²²². Todo esto, junto con su compleja regulación, y la diversidad en las vías de señalización que activa, hacen que el bloqueo efectivo de las respuestas de CTGF sea una labor difícil. Actualmente los estudios de inhibición de CTGF están dirigidos hacia el desarrollo de ODN antisentido, ARN de interferencia o anticuerpos neutralizantes que bloqueen CTGF endógeno²²². En un modelo de fibrosis hepática, el tratamiento con un ARN de interferencia para CTGF vía vena intraportal, redujo la expresión de CTGF y atenuó la fibrosis hepática al reducir la acumulación de MEC¹²⁷. El bloqueo de CTGF mediante ODN antisentido, reduce la producción de fibronectina y colágenos I y IV en ratones con nefropatía diabética, lo que sugiere que el bloqueo de CTGF puede ser una buena alternativa en el tratamiento de esta enfermedad⁷⁹.

Estudios recientes en pacientes con nefropatía diabética han descrito que niveles elevados de CTGF en plasma contribuyen a la predicción de enfermedad renal en etapas avanzadas^{109,163}, y puede ser considerado como un marcador temprano de la progresión de la disfunción renal en el riñón diabético²³⁵. Además en estudios en pacientes con nefropatía IgA, se ha observado que niveles elevados de proteínas

en orina y así como la expresión de CTGF y TGF- β , están correlacionados con el grado del daño tubulointersticial¹⁶⁷. En otras patologías como el daño cardíaco crónico, se ha sugerido que los niveles de CTGF en plasma suponen un nuevo marcador de disfunción cardíaca que proporciona información sobre la aparición de fibrosis miocárdica¹¹⁸. Estos datos indican que aunque son necesarios más estudios, CTGF es un buen candidato como potencial biomarcador de la progresión del daño renal.

En conclusión, los resultados mostrados en esta tesis muestran la gran complejidad en la regulación de CTGF, no sólo debida a las múltiples vías de señalización intracelular que lo modulan dependiendo del tipo celular, sino también causada por la existencia de factores activadores y de reguladores negativos que condicionan su síntesis y el desarrollo de sus respuestas. Los estudios *in vivo* demuestran que CTGF participa en todas las etapas del daño renal: en las etapas iniciales promoviendo la respuesta inflamatoria, activando el factor de transcripción NF κ B a través del cual media la producción de quimioquinas y citoquinas que favorecen el infiltrado de células inflamatorias; y en etapas avanzadas, regulando la expresión de proteínas de matriz extracelular (colágeno IV y fibronectina en CM), promoviendo la fibrosis y la TEM. Todos los datos presentados en esta tesis contribuyen a ampliar el conocimiento del papel de CTGF en la patogenia del daño renal.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- I. Los estudios realizados en un modelo experimental de daño renal causado por infusión sistémica de AngII en rata demuestran que CTGF está aumentado en las diferentes etapas del daño renal: al inicio de la lesión coincidiendo con la producción de mediadores inflamatorios (como IL-6, TNF- α y MCP-1) y el reclutamiento de células inflamatorias (macrófagos); cuando aparece la fibrosis caracterizada por la acumulación de proteínas de matriz extracelular (fibronectina); y en etapas más avanzadas, coincidiendo con la síntesis de TGF- β y la regulación de marcadores de transición epitelio-mesénquima (E-cadherina y α -SMA).
- II. CTGF es un mediador de la respuesta fibrótica causada por AngII en células mesangiales, regulando la expresión y producción de fibronectina y colágeno IV. Estos datos sugieren que CTGF tiene un papel importante en la patogenia de la fibrosis renal.
- III. En estudios *in vitro* hemos demostrado que CTGF está regulado por la activación de múltiples vías de señalización intracelular (como MAPK, NF κ B y ROS), existiendo una diferente regulación dependiendo del tipo celular. Diversos factores implicados en el daño renal inducen la producción de CTGF, actuando de manera aditiva, como TGF- β y AngII. Por el contrario, IL-1 β es capaz de bloquear la respuesta fibrótica de AngII, actuando como un regulador negativo de la expresión y producción de CTGF y colágeno IV. Este mecanismo inhibitorio se debe a la activación sinérgica de la quinasa ERK1/2, la cual a su vez modula la actividad de MMP-9 (proteasa degradadora de colágeno IV).
- IV. En un modelo experimental de administración sistémica de CTGF en ratones, hemos observado que CTGF causa una rápida respuesta inflamatoria en el riñón a través de la activación de la ruta del factor de transcripción NF κ B, la inducción de mediadores inflamatorios, como quimioquinas (MCP-1 y RANTES) y citoquinas (IL-6, IL-4, INF- γ); y el reclutamiento de macrófagos y linfocitos T.
- V. En células tubuloepiteliales, CTGF activa la ruta de NF κ B por un proceso regulado por la cascada de señalización de MAPK, induciendo la expresión de quimioquinas (MCP-1), citoquinas (IL-6) y moléculas de adhesión (ICAM-1) implicadas en la respuesta inflamatoria.

Los datos presentados en esta tesis demuestran la complejidad en las vías de señalización intracelular que modulan la producción de CTGF así como la existencia de factores activadores (AngII, IL-6 y TGF- β solos o en combinación), y de reguladores negativos de su expresión y sus acciones como es el caso de IL-1 β . Los estudios *in vivo* demuestran que CTGF, además de contribuir a la fibrosis renal, ejerce un papel fundamental en las etapas iniciales del daño activando el factor de transcripción NF κ B, a través del cual regula la producción de quimioquinas y citoquinas que favorecen el infiltrado de células inflamatorias. Los resultados presentados en esta tesis contribuyen a ampliar el conocimiento de CTGF en la patogenia del daño renal.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask a. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal, and scleroderma fibroblast. *J Biol Chem.* 275:1520-1525. 2000.
2. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective tissue growth factor (CTGF) modulates cell signaling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol.* 275:15220-15225. 2000.
3. Ajuebor MN, Das AM, Virág L, Flower RJ, Szabó C, Perretti M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol.* 1;162(3):1685-91. 1999.
4. Akool ES, Doller A, Muller R, Gutwein P, Xin C, Huwiler A, Pfelschifter J, Eberhardt W. Nitric oxide induces TIMP-1 expression by activating the transforming growth factor b-Smad signaling pathway. *J Biol Chem.* 280:39403-39416. 2005.
5. Albiston AL, Herington AC: Cloning and characterization of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 166:892-897. 1990.
6. Ardailluo R, Chansel D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int.* 52: 1458-1468. 1997.
7. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 55(2):241-69. 2003.
8. Babic AM, Chen CC, Lau LF. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphaVbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol.* 19:2958-2966. 1999.
9. Basile DP. The transforming growth factor beta system in kidney disease and repair: Recent progress and future directions. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 8: 21-30. 1999.
10. Baud L, Oudinet JP, Bens M, Noe L, Peraldi MN, Rondeau E, Etienne J, Ardaillou R. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int.* 35(5):1111-8. 1989.
11. Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502. 1989.

12. Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, Mengozzi M, Cota M, Polentarutti N, Mantovani A, Lazzarin A, Sozzani S, and Poli G. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood*. 91:258–265. 1998.
13. Bogdan C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci*. 23:685:713-39. 1993.
14. Bokemeyer D, Panek D, Kramer HJ, Lindemann M, Kitahara M, Boor P, Kerjaschki D, Trzaskos JM, Floege J, Ostendorf T. *In vivo* identification of the mitogen-activated protein kinase cascade as a central pathogenic pathway in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 13:1473-1480, 2002.
15. Border WA, Noble NA: Interactions of transforming growth factor-b and angiotensina II in renal fibrosis. *Hypertension*. 31:181-188. 1998.
16. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor-b in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 331.1286-1292. 1994.
17. Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett*. 327:125-130. 1993.
18. de Borst MH, van Timmeren MM, Vaidya VS, de Boer RA, van Dalen MB, Kramer AB, Schuurs TA, Bonventre JV, Navis G, van Goor H. Induction of kidney injury molecule-1 in homozygous Ren2 rats is attenuated by blockade of the renin-angiotensin system or p38 MAP kinase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 292(1):F313-20. 2007
19. de Borst MH, Navis G, de Boer RA, Huitema S, Vis LM, van Gilst WH, van Goor H. Specific MAP-kinase blockade protects against renal damage in homozygous TGR(mRen2)27 rats. *Lab Invest*. 83(12):1761-70. 2003.
20. Bossé Y, Thompson C, Audette K, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Interleukin-4 and Interleukin-13 Enhance Human Bronchial Smooth Muscle Cell Proliferation. *Int Arch Allergy Immunol*. 146(2):138-148. 2008.
21. Böttinger EP, Letterio JJ, Roberts AB. Biology of TGF-b in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int*. 51:1355-1360. 1997.
22. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol*. 59(1):13-23. 2000.
23. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol*. 114:1285-1294. 1991.

24. Brady, H. R.: Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int* 45:1285-1300, 1994.
25. Brasier, A. R., Recinos, A., III, and Eledrisi, M. S.: Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:1257-1266. 2002.
26. Brigstock DR. The connective tissue growth factor /cysteine –rich 61 /nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev.* 20:189-206.1999.
27. Brinkman A, Groffen C, Kortleve DJ, Geurts van Kessel A, Drop SL. Isolation and characterization of a cDNA encoding the low molecular weight insulin-like growth factor binding protein (IBP-1). *EMBO J.* 7:2417-2423. 1988.
28. Brunner A, Chinn J, Neubauer M, Purchio AF. Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol.* 10:293-300. 1991.
29. Burns WC, Twigg SM, Forbes JM, Pete J, Tikellis C, Thallas-Bonke V, Thomas MC, Cooper ME, Kantharidis P. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 17(9):2484-94. 2006.
30. Burson JM, Aguilera G, Gross KW, and Sigmund CD: Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol* 267:E260-E267. 1994.
31. Bustos C, González-Cuadrado S, Ruiz-Ortega M, Gómez-Guerrero C, González E, Plaza JJ, Egido J. Cyclosporin A (CsA) modulates the glomerular production of inflammatory mediators and proteoglycans in experimental nephrosis. *Clin Exp Immunol.* 102(3):608-13. 1995.
32. Carvajal G, Rodríguez-Vita J, Rodríguez-Díez R, Sánchez-López E, Rupérez M, Cartier C, Esteban V, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int* en prensa
33. Carvalho-Pinto CE, García MI, Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Martín-Caballero J, Flores J, Martínez-A C, Balomenos D. Autocrine production of IFN-gamma by macrophages controls their recruitment to kidney and the development of glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 169(2):1058-67. 2002.
34. Castilla, M. A., Caramelo, C., Gazapo, R. M., Martín, O., Gonzalez-Pacheco, F. R., Tejedor, A., Bragado, R., and Arroyo, M. V.: Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sci* 67:1003-1013, 2000.
35. Colotta F, Sironi M, Borrelli A, Luini W, Maddalena F, Mantovani A. Interleukin 4 amplifies monocyte chemotactic protein and interleukin 6 production by endothelial cells. *Cytokine.* 4(1):24-8. 1992.

36. Crean JK, Finlay D, Murphy M, Moss C, Godson C, Martin F, Brady HR. The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells. *J Biol Chem*. 277(46):44187-94. 2002.
37. da Cunha V, Martin-McNulty B, Vincelette J, Choy DF, Li WW, Schroeder M, Mahmoudi M, Halks-Miller M, Wilson DW, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX. Angiotensin II induces histomorphologic features of unstable plaque in a murine model of accelerated atherosclerosis. *J Vasc Surg* 44:364-371. 2006.
38. Chaqour B, Yang R, Sha Q. Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 281(29):20608-22. 2006.
39. Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblast. *J Biol Chem*. 276:10443-10452. 2001.
40. Chen G, Grotendorst G, Eichholtz T, Khalil N. GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF-beta receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 284(3):L548-56. 2003.
41. Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int*. 62(4):1149-59. 2002.
42. Chen Y, Abraham DJ, Shi-Wen X, Pearson JD, Black CM, Lyons KM, et al. CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell*. 15:5635-46. 2004.
43. Cheng J, Díaz Encarnacion MM, Warner GM, Gray CE, Nath KA, Grande JP. TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C959-C970, 2005.
44. Choi YK, Kim YJ, Park HS, Choi K, Paik SG, Lee YI, Park JG. Suppression of glomerulosclerosis by adenovirus-mediated IL-10 expression in the kidney. *Gene Ther*. 10(7):559-68. 2003.
45. Dammeier J, Beer HD, Brauchle M, Werner S. Dexamethasone is a novel potent inducer of connective tissue growth factor expression. Implications for glucocorticoid therapy. *J Biol Chem*. 273:18185-18190. 1998.
46. Daphna-Iken D, Morrison AR. Interleukin-1 beta induces interstitial collagenase gene expression and protein secretion in renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 269:F831-F837. 1995.

47. Deckers JG, De Haij S, van der Woude FJ, van der Kooij SW, Daha MR, van Kooten C. IL-4 and IL-13 augment cytokine- and CD40-induced RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 9(7):1187-93. 1998.
48. Dinarello CA: Interleukin-1beta. *Crit Care Med.* 33:S460-S462, 2005.
49. Donaldson A, Daphna-Iken D, Tetsuka T, Morrison AR: Interleukin-1 beta activates PI 3-kinase in renal mesangial cells. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 227:289-293. 1996.
50. Dorsam G, Taher MM, Valerie KC, Kuemmerle NB, Chan JC, Franson RC. Diphenyleneiodium chloride blocks inflammatory cytokine-induced up-regulation of group IIA phospholipase A(2) in rat mesangial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 292(3):1175. 2000.
51. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:7686-7689. 1995.
52. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta induced collagen synthesis: downregulation by cAMP. *FASEB J.* 13:1774-1786. 1999.
53. Duque N, Gomez-Guerrero C, and Egido J: Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8 and IFN-inducible protein 10. *J Immunol.* 159:3474-3482. 1997.
54. Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J. Amplification of IL-1 β -induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF- κ B, and activating protein-1 and involves activation of the mitogenactivated protein kinase pathways. *J Immunol* 165: 5788–5797, 2000Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 7:2495-2505. 1996.
55. Eberhardt W, Schulze M, Engels C, Klasmeier E, Pfeilschifter J. Glucocorticoid-mediated suppression of cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat mesangial cells: involvement of nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors. *Mol Endocrinol.* 16(8):1752-66. 2002.
56. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 7:2495-2505. 1996.
57. Efrati, S., Berman, S., Goldfinger, N., Erez, N., Averbukh, Z., Golik, A., Rotter, V., and Weissgarten, J.: Enhanced angiotensin II production by renal mesangium is responsible for apoptosis/proliferation of endothelial and epithelial cells in a model of malignant hypertension. *J Hypertens* 25:1041-1052. 2007.

-
58. Egido J, Gómez-Chiarri M, Ortíz A, Bustos C, Alonso J, Gómez-Guerrero C, Gómez-Garre D, López-Armada MJ, Plaza J, Gonzalez E. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of glomerular diseases. *Kidney Int Suppl.* 39:S59-64. 1993.
59. Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 15 (6):1514-29. 2004.
60. Fan JM, Huang XR, Ng YY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY: Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro. *Am.J.Kidney Dis.* 37:820-831. 2001.
61. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Human recombinant interleukin-4 induces proliferation and interleukin-6 production by cultured human skin fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol.* 63(2):182-7. 1992.
62. Feliers D, Duraisamy S, Barnes JL, Ghosh-Choudhury G, Kasinath BS. Translational regulation of vascular endothelial growth factor expression in renal epithelial cells by angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288(3):F521-9. 2005.
63. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9:669-676. 2003.
64. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147(11):3815-22. 1991.
65. Flanc RS, Ma FY, Tesch GH, Han Y, Atkins RC, Bennett BL, Friedman GC, Fan JH, Nikolic-Paterson DJ. A pathogenic role for JNK signaling in experimental anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.* 72:698-708. 2007.
66. Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol.* 85:47-64. 2004.
67. Frazier KS, Paredes A, Dube P, Styer E. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation. *Vet Pathol.* 37:328-335. 2000.
68. Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles DE, Willson TM, Liu X, Chen YE. Peroxisome proliferators activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta- induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with smad3. *J Biol Chem.* 276:45888-45894. 2001.
69. Fukushi J, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y, Kuwano M. The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 165(5):2818-23. 2000.

-
70. Furlong F, Crean J, Thornton L, O'Leary R, Murphy M, Martin F. Dysregulated intracellular signaling impairs CTGF-stimulated responses in human mesangial cells exposed to high extracellular glucose. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292(6):F1691-700. 2007.
 71. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Sugaya T, Iwakura Y, Matsushima K, Asano M, Yokoyama H, Kaneko S. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med.* 34(9):2447-55. 2006.
 72. Furusu A, Miyazaki M, Koji T, Abe K, Ozono Y, Harada T, Nakane PK, Hara K, Kohno S. Involvement of IL-4 in human glomerulonephritis: an in situ hybridization study of IL-4 mRNA and IL-4 receptor mRNA. *J Am Soc Nephrol.* 8(5):730-41. 1997.
 73. Gao R, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin $\alpha 5 \beta 1$ as a novel CCN2 receptor. *Gastroenterology.* 129(3): 1019-1030. 2005.
 74. Gao R, Brigstock DR. Activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) by connective tissue growth factor (CCN2) is involved in sustaining the survival of primary rat hepatic stellate cells. *Cell Commun Signal.* 22;3:14. 2005.
 75. Gorin Y, Ricono JM, Wagner B, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE: Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *Biochem J.* 381:231-239. 2004.
 76. Grainger, D. J.: Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:399-404. 2004.
 77. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ.* 7:469-480. 1996.
 78. Guan Z, Buckman SY, Springer LD, Morrison AR. Both p38alpha(MAPK) and JNK/SAPK pathways are important for induction of nitric-oxide synthase by interleukin-1beta in rat glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 274:36200-36206. 1999.
 79. Guha M, Xu ZG, Tung D, Lanting L, Natarajan R. Specific down-regulation of connective tissue growth factor attenuates progression of nephropathy in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *FASEB J.* 21(12):3355-68. 2007.
 80. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int.* 59(2):415-24. 2001.
 81. Guo G, Morrissey J, McCracken R, Tolley T, Klahr S. Role of TNFR1 and TNFR2 receptors in tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Physiol.* (5 Pt 2):F766-72. 1999

-
82. Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int.* 58(4):1389-99. 2000.
 83. Haberstroh U, Pocock J, Gómez-Guerrero C, Helmchen U, Hamann A, Gutierrez-Ramos JC, Stahl RA, Thaiss F. Expression of the chemokines MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 is differentially regulated by infiltrating inflammatory cells. *Kidney Int.* 62(4):1264-76. 2002.
 84. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE.* Oct 17;2006(357):re13. 2006.
 85. de Haij S, Bakker AC, van der Geest RN, Haegeman G, Vanden Berghe W, Aarbiou J, Daha MR, van Kooten C. NF-kappaB mediated IL-6 production by renal epithelial cells is regulated by c-jun NH2-terminal kinase. *J Am Soc Nephrol.* 16:1603-1611. 2005.
 86. Hahn A, Heusinger-Ribeiro J, Lanz T, Zenkel S, Goppelt-Struebe M. Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 275(48):37429-35. 2000.
 87. Hamanaka R, Kohno K, Seguchi T, Okamura K, Morimoto A, Ono M, Ogata J, Kuwano M. Induction of low density lipoprotein receptor and a transcription factor SP-1 by tumor necrosis factor in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 267(19):13160-5. 1992.
 88. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res.* 84(6):695-703. 1999.
 89. Hao J, Wang B, Jones SC, Jassal DS, Dixon IM. Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279:H3020-H3030. 2000.
 90. He Z, Way KJ, Arikawa E, Chou E, Opland DM, Clermont A, Isshiki K, Ma RC, Scott JA, Schoen FJ, Feener EP, King GL. Differential regulation of angiotensin II-induced expression of connective tissue growth factor by protein kinase C isoforms in the myocardium. *J Biol Chem.* 280:15719-15726. 2005.
 91. Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, Goppelt-Struebe M. Expresión of connective tissue growth factor in human renal fibroblast: Regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol.* 12:1853-1851. 2001.
 92. Hishikawa K, Nakaki T, Fujii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis via caspase 3 in cultured human aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 392(1-2):19-22. 2000.

-
93. Ho C, Lee PH, Huang WJ, Hsu YC, Lin CL, Wang JY. Methylglyoxal-induced fibronectin gene expression through Ras-mediated NADPH oxidase activation in renal mesangial cells. *Nephrology (Carlton)*. 12:348-356. 2007.
 94. Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem*. 276: 10594-10601. 2001.
 95. Holt GD, Pangburn MK, Ginsburg V. Properdin binds to sulfatide [Gal(3-SO₄)beta 1-1 Cer] and has a sequence homology with other proteins that bind sulfated glycoconjugates. *J Biol Chem*. 265:2852-2855. 1990.
 96. Hoshijima M, Hattori T, Inoue M, Araki D, Hanagata H, Miyauchi A, Takigawa M. CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin $\alpha 5\beta 1$, *FEBS Lett*. 580:1376–1382. 2006.
 97. Huang S, Konieczkowski M, Schelling JR, Sedor JR. Interleukin-1 stimulates Jun N-terminal/stress-activated protein kinase by an arachidonate-dependent mechanism in mesangial cells. *Kidney Int* 55:1740-1749. 1999.
 98. Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lavoie JP. IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292(5):L1147-54. 2007.
 99. Huang Z, Taylor L, Liu B, Yu J, Polgar P. Modulation by bradykinin of angiotensin type 1 receptor-evoked RhoA activation of connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 290:L1291-L1299. 2006.
 100. Hung JH, Su IJ, Lei HY, Wang HC, Lin WC, Chang WT, Huang W, Chang WC, Chang YS, Chen CC, Lai MD. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 279(45):46384-92. 2004.
 101. Huwiler A, Pfeilschifter J: Interleukin-1 stimulates de novo synthesis of mitogen-activated protein kinase in glomerular mesangial cells. *FEBS Lett*. 350:135-138. 1994.
 102. Ikeda M, Ikeda U, Oohara T, Takeda K, Kano S: Recombinant interleukin-1 alpha inhibits the growth of rat mesangial cells in culture. *Clin.Exp.Immunol*. 83:149-153. 1991.
 103. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y, and Kano S. Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF dependent manner. *Am J Physiol*. 260:H1713–H1717. 1991.
 104. Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening jj, Goldschmeding R. Expresión of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int*. 53:853-861. 1998.

105. Ito Y, Goldschmeding R, Bende RJ, Claessen N, Chand MA, Kleij L, Rabelink TJ, Weening JJ, Aten J. Kinetics of connective tissue growth factor expression during experimental proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 12: 472-484. 2001.
106. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libada DE, Stepheson RC, Daluiski A, Lyons KM. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development*. 130: 2779-2791. 2003.
107. Iwanciw D, Rehm M, Porst M, Goppelt-Strube M. Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:1782-1787. 2003.
108. Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam. Horm.* 74:371-403. 2006.
109. Jaffa AA, Usinger WR, McHenry MB, Jaffa MA, Lipstiz SR, Lackland D, Lopes-Virella M, Luttrell LM, Wilson PW. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Group. Connective Tissue Growth Factor and Susceptibility to Renal and Vascular Disease Risk in Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(5):1893-1900. 2008.
110. Jedsadayanmata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SC. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem.* 274:24321-24327. 1999.
111. Jiang B, Xu S, Brecher P, Cohen RA: Growth factors enhance interleukin-1 beta-induced persistent activation of nuclear factor-kappa B in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:1811-1816, 2002.
112. Kang YS, Park YG, Kim BK, Han SY, Jee YH, Han KH, Lee MH, Song HK, Cha DR, Kang SW, Han DS. Angiotensin II stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor through the p38 mitogen activated protein kinase pathway in cultured mouse podocytes. *J Mol Endocrinol.* 36:377-388, 2006.
113. Khachigian LM, Collins T, Fries JW. Nuclear factor-kappa B mediates induction of vascular cell adhesion molecule-1 in glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 206:462-467. 1995.
114. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:12981-12986. 1997.
115. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 86(4):1243-54. 1995.

116. Kitching AR, Tipping PG, Timoshanko JR, Holdsworth SR. Endogenous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 57(2):518-25. 2000.
117. Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kämpgen E, Romani N, Schuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med.* 184(2):741-6. 1996.
118. Koitabashi N, Arai M, Niwano K, Watanabe A, Endoh M, Suguta M, Yokoyama T, Tada H, Toyama T, Adachi H, Naito S, Oshima S, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M. Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 10(4):373-9. 2008.
119. van Kooten C, van der Linde X, Woltman AM, van Es LA, Daha MR. Synergistic effect of interleukin-1 and CD40L on the activation of human renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 56:41-51. 1999.
120. Kubota S, Kawaki H, Kondo S, Yosimichi G, Minato M, Nishida T, Hanagata H, Miyauchi A, Takigawa M. Multiple activation of mitogen-activated protein kinases by purified independent CCN2 modules in vascular endothelial cells and chondrocytes in culture. *Biochimie.* 88(12):1973-81. 2006
121. Kuroiwa T, Schlimgen R, Illei GG, and et al: Distinct T cell/renal tubular epithelial cell interactions define differential chemokines production: implications for tubulointerstitial injury in chronic glomerulonephritides. *J Immunol* 164:3329. 2000.
122. Lam S, van der Geest RN, Verhagen NA, Daha MR, van Kooten C. Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF-beta-independent pathway. *Nephrol Dial Transplant.* 19(7):1694-701. 2004.
123. Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res.* 248(1):44-57. 1999.
124. Lee CI, Guh JY, Chen HC, Lin KH, Yang YL, Hung WC, Lai YH, Chuang LY. Leptin and connective tissue growth factor in advanced glycation end-product-induced effects in NRK-49F cells. *J Cell Biochem.* 93(5):940-50. 2004.
125. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR: A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 372:739-746. 1994.
126. Lee YJ, Heo JS, Suh HN, Lee MY, Han HJ. Interleukin-6 stimulates alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells: involvement of STAT3, PI3K/Akt, MAPKs, and NF-kappaB. *Am J Physiol Renal Physiol.* 293(4):F1036-46. 2007.

127. Li GM, Li DG, Xie Q, Shi Y, Jiang S, Zhou HJ, Lu HM, Jin YX. Effect of silencing connective tissue growth factor on rat liver fibrosis and the accumulation of extracellular matrix. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 16(3):188-92. 2008.
128. Liu B, Yu J, Taylor L, Zhou X, Polgar P. Microarray and phosphokinase screenings leading to studies on ERK and JNK regulation of connective tissue growth factor expression by angiotensin II 1a and bradykinin B2 receptors in Rat1 fibroblasts. *J. Cell. Biochem*. 97:1104-1120. 2006.
129. Liu BC, Li MX, Zhang JD, Liu xc, Zhang XL, Phillips AO. Inhibition of integrin-linked kinase via siRNA expression plasmid attenuates connective tissue growth factor-induced human proximal tubular epithelial cells to mesenchymal transition. *Am J Nephrol*. 28(1):143-51. 2008.
130. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*. 69(2):213-7. 2006.
131. Liu X, Luo F, Pan K, Wu W, Chen H. High glucose upregulates connective tissue growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*. 16;8:1. 2007.
132. Liu XC, Liu BC, Zhang XL, Li MX, Zhang JD. Role of ERK1/2 and PI3-K in the regulation of CTGF-induced ILK expression in HK-2 cells. *Clin Chim Acta*. 382(1-2):89-94. 2007.
133. López-Franco O, Suzuki Y, Sanjuan G, Blanco J, Hernandez-Vargas P, Yo Y, Kopp J, Egido J, and Gomez-Guerrero C. Nuclear factor kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 161:1497-1505. 2002.
134. Lloyd CM, Dorf ME, Proudfoot A, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC. Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis. *J Leukoc Biol*. 62(5):676-80. 1997.
135. Ma FY, Flanc RS, Tesch GH, Han Y, Atkins RC, Bennett BL, Friedman GC, Fan JH, Nikolic-Paterson DJ. A pathogenic role for c-Jun amino-terminal kinase signaling in renal fibrosis and tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 18:472-484. 2007.
136. Makino H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Suganami T, Yahata K, Fujinaga Y, Yokoi H, Tanaka I, Nakao K. Role of connective tissue growth factor and prostanoids in early streptozotocin-induced diabetic rat kidney: The effect of aspirin treatment. *Clin Exp Nephrol* 7:33-40. 2003.
137. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 264:19514-19527. 1989.
138. Mantovani A. The interplay between primary and secondary cytokines: cytokines involved in the regulation of monocyte recruitment. *Drugs*. 54(1):15-23. 1997.

-
139. Martinerie C, Viegas-Pequignot E, Guenard I, Dutrillaux B, Nguyen VC, Bernheim A, Perbal B. Physical mapping of human loci homologous to the chicken *nov* proto-oncogene. *Oncogene*. 7:2529-2534. 1992.
140. Masaki T, Stambe C, Hill PA, Dowling J, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Activation of the extracellular-signal regulated protein kinase pathway in human glomerulopathies. *J Am Soc Nephrol* 15:1835-1843. 2004.
141. Matsui Y, Sadoshima J. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 37:477-481. 2004.
142. Mayor F, Jurado-Pueyo M, Campos PM, Murga C. Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle* 6:528-533. 2007.
143. McDonald, M. C., Mota-Filipe, H., Paul, A., Cuzzocrea, S., Abdelrahman, M., Harwood, S., Plevin, R., Chatterjee, P. K., Yaqoob, M. M., and Thiemermann, C.: Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEB J*. 15:171-186. 2001.
144. Meldrum KK, Metcalfe P, Leslie JA, Misseri R, Hile KL, Meldrum DR. TNF-alpha neutralization decreases nuclear factor-kappaB activation and apoptosis during renal obstruction. *J Surg Res*. 131:182-188. 2006.
145. Menè P, Dunn MJ. Prostaglandins and rat glomerular mesangial cell proliferation. *Kidney Int*. 37(5):1256-62. 1990.
146. Mené P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev*. 69(4):1347-424. 1989.
147. Meng X, Zhu Z, Yang X, Deng A. Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro. *Life Sci*. 75(3):367-79. 2004.
148. Mezzano S, Barria M, Droguett A, et al. Tubular NF-kB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int*. 60:1366-1377. 2001
149. Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Aros CA, Caorsi I, Egido J. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int*. 57:147-158. 2000.
150. Mishra R, Zhu L, Eckert RL, Simonson MS. TGF-beta-regulated collagen type I accumulation: role of Src-based signals. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292(4):C1361-9. 2007.
151. Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, Cheshire N, Paleolog E, Feldmann M. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates

- proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(15):5634-9. 2004.
152. Moriyama T, Fujibayashi M, Fujiwara Y, Kaneko T, Xia C, Imai E, Kamada T, Ando A, Ueda N. Angiotensin II stimulates interleukin-6 release from cultured mouse mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 6(1):95-101. 1995.
 153. Mu W, Ouyang X, Agarwal A, Zhang L, Long DA, Cruz PE, Roncal CA, Glushakova OY, Chiodo VA, Atkinson MA, Hauswirth WW, Flotte TR, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 16(12):3651-60. 2005.
 154. Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, Brady HR. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem*. 274(9), 5830-5834. 1999.
 155. Nagai Y, Miyata K, Sun GP, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Yoshizumi M, Nishiyama A. Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension* 46:1039-1045. 2005.
 156. Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson DJ, Tanji C, Yorioka N, Kohno N. Angiotensin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p38 MAPK and JNK: a mechanism for activation of latent TGF-beta1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 286(2), F278-F287. 2004.
 157. Nakazato Y, Okada H, Tajima S, Hayashida T, Kanno Y, Suzuki H, Saruta T. Interleukin-4 modulates collagen synthesis by human mesangial cells in a type-specific manner. *Am J Physiol*. 270(3 Pt 2):F447-53. 1996.
 158. Nakazato Y, Hayashida T, Kanno Y, Sasamura H, Okada H, Suzuki H, Saruta T. Interleukin (IL)-1 and IL-4 synergistically stimulate NF-IL6 activity and IL-6 production in human mesangial cells. *Kidney Int*. 54(1):71-9. 1998.
 159. Nath, K. A.: Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 20:1-17. 1992.
 160. Nawachi K, Inoue M, Kubota S, Nishida T, Yosimichi G, Nakanishi T, Kanyama M, Kuboki T, Yatani H, Yamaai T, Takigawa M. Tyrosine Kinase-type receptor ErbB4 in chondrocytes: interaction with connective tissue growth factor and distribution in cartilage. *FEBS Lett*. 528:109-113. 2002.
 161. Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25:257-260. 2000.
 162. Neilson EG. Mechanisms of disease: Fibroblasts--a new look at an old problem. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2:101-118. 2006.

-
163. Nguyen TQ, Tarnow L, Jorsal A, Oliver N, Roestenberg P, Ito Y, Parving HH, Rossing P, van Nieuwenhoven FA, Goldschmeding R. Plasma connective tissue growth factor is an independent predictor of end-stage renal disease and mortality in type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. Mar 14. 2008.
164. Niculescu-Duvaz I, Phanish MK, Colville-Nash P, Dockrell ME. The TGF β 1-induced fibronectin in human renal proximal tubular epithelial cells is p38 MAP kinase dependent and Smad independent. *Nephron Exp Nephrol*. 105:e108-e116. 2007.
165. Niimi R, Nakamura A, Yanagawa Y. Suppression of endotoxin-induced renal tumor necrosis factor- α and interleukin-6 mRNA by renin-angiotensin system inhibitors. *Jpn J Pharmacol*. 88(2):139-45. 2002.
166. Nishida T, Nakanishi T, Shimo T, Asano M, Hattori T, Tamatani T, Tezuka K, Takigawa M. Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochem Biophys Res Commun*. 247:905-909. 1998.
167. Nonaka Takahashi S, Fujita T, Takahashi T, Wada Y, Fuke Y, Satomura A, Matsumoto K. TGF- β 1 and CTGF mRNAs are correlated with urinary protein level in IgA nephropathy. *J Nephrol*. 21(1):53-63. 2008.
168. Nowinski D, Hoijer P, Engstrand T, Rubin K, Gerdin B, Ivarsson M. Keratinocytes inhibit expression of connective tissue growth factor in fibroblast in vitro by interleukin-1- α -dependent mechanism. *J Invest Dermatol*. 119:449-455. 2002.
169. Ooi BS, Cohen DJ, Veis JH. Biology of the mesangial cell in glomerulonephritis--role of cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med*. 213(3):230-7. 1996.
170. Park JK, Fischer R, Dechend R, Shagdarsuren E, Gapeljuk A, Wellner M, Meiners S, Gratz P, Al-Saadi N, Feldt S, Fiebeler A, Madwed JB, Schirdewan A, Haller H, Luft FC, Muller DN. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition ameliorates angiotensin II-induced target organ damage. *Hypertension*. 49:481-489. 2007.
171. Park SK, Kim J, Seomun Y, Choi J, Kim DH, Han IO, Lee EH, Chung SK, Joo CK. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 284(4):966-71. 2001.
172. Park SK, Yang WS, Lee SK, Ahn H, Park JS, Hwang O, Lee JD: TGF- β 1 down-regulates inflammatory cytokine-induced VCAM-1 expression in cultured human glomerular endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 15:596-604. 2000.
173. Patel NS, Chatterjee PK, Di Paola R, Mazzone E, Britti D, De Sarro A, Cuzzocrea S, Thiemermann C. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 312(3):1170-8. 2005

-
174. Patterson D, Jones C, Hart I, Bleskan J, Berger R, Geyer D, Eisenberg SP, Smith MF Jr., Arend WP. The human interleukin-1 receptor antagonist (IL1RN) gene is located in the chromosome 2q14 region. *Genomics*. 15(1): 173-176. 1993.
175. Pawluczyk IZ, Harris KP. Cytokine interactions promote synergistic fibronectin accumulation by mesangial cells. *Kidney Int*. 54:62-70. 1998.
176. Pearson, G., Robinson, F., Beers, Gibson T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183. 2001.
177. Perbal B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional features. *Mol. Pathol.* 54:57-79. 2001.
178. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet*. 363:62-64. 2004.
179. Phanish MK, Wahab NA, Hendry BM, Dockrell ME. TGF-beta1-induced connective tissue growth factor (CCN2) expression in human renal proximal tubule epithelial cells requires Ras/MEK/ERK and Smad signalling. *Nephron Exp Nephrol*. 100:e156-e165. 2005.
180. Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs* 3:569-577. 2002.
181. Pollock AS, Turck J, Lovett DH. The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells. *FASEB J*. 17(2):203-13. 2003
182. Pradier O, Gérard C, Delvaux A, Lybin M, Abramowicz D, Capel P, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol*. 23(10):2700-3. 1993.
183. Prakash J, Sandovici M, Saluja V, Lacombe M, Schaapveld RQ, de Borst MH, van Goor H, Henning RH, Proost JH, Moolenaar F, Keri G, Meijer DK, Poelstra K, Kok RJ. Intracellular delivery of the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190 [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole] in renal tubular cells: a novel strategy to treat renal fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 319:8-19. 2006.
184. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, Klar-Mohamad N, Gerritsen AF, Bruijn JA, Daha MR, van Es L A. Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int*. 48:1477-1486. 1995.
185. Quiroz Y, Bravo J, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B. Apoptosis and NFkappaB activation are simultaneously induced in renal tubulointerstitium in experimental hypertension. *Kidney Int Suppl*. S27-S32. 2003.

-
186. Rice EK, Nikolic-Paterson DJ, Hill PA, Metz CN, Bucala R, Atkins RC, Tesch GH. Interferon-gamma induces macrophage migration inhibitory factor synthesis and secretion by tubular epithelial cells. *Nephrology (Carlton)*. 8(3):156-61. 2003.
187. Rimon E, Chen B, Shanks AL, Nelson DM, Sadovsky Y. Hypoxia in human trophoblasts stimulates the expression and secretion of connective tissue growth factor. *Endocrinology*. Feb 21. 2008.
188. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultures rat mesangial cells and its expresión in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 11:25-38. 2000.
189. Riser BL, Cortes P. Connective tissue growth factor and its regulation: a new element in diabetic glomeruloesclerosis. *Ren Fail*. 23:459-470. 2001.
190. Rishikof DC, Ricupero DA, Kuang PP, Liu H, Goldstein RH. Interleukin-4 regulates connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts. *J Cell Biochem*. 85(3):496-504. 2002.
191. Roberts AB, Tian F, Byfield SD *et al.*: Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 17:19-27. 2006.
192. Rodríguez-Díez R, Carvajal-González G, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Díez RR, Selgas R, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by Angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways. *Pharmaceutical Research* en prensa.
193. Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Esteban V, Rupérez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II Activates The Smad Pathway In Vascular Smooth Muscle Cells. Potential role in vascular fibrosis. *Circulation*. 111:2509-2517. 2005.
194. Rölz W, Xin C, Ren S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Interleukin-1 inhibits angiotensin II-stimulated protein kinase B pathway in renal mesangial cells via the inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. 442(3):195-203. 2002.
195. Rovin BH, Lu L, Marsh CB. Lymphocytes induce monocyte chemoattractant protein-1 production by renal cells after Fc gamma receptor cross-linking: role of IL-1beta. *J Leukoc Biol*. 69(3):435-9. 2001.
196. Rovin BH, Wilmer WA, Danne M, Dickerson JA, Dixon CL, Lu L. The mitogen-activated protein kinase p38 is necessary for interleukin 1beta-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression by human mesangial cells. *Cytokine*. 11:118-126. 1999.
197. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Fassler J. Modulation of IL-1-induced chemokine expression in human mesangial cells through alterations in redox status. *Cytokine*. 9:178-186. 1997.

-
198. Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 74:196-206. 2007.
199. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 15:159-166. 2006.
200. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, Egido J. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol.Dial.Transplant*. 21:16-20, 2006.
201. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Blanco J, Egido J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am.J.Pathol*. 158:1743-1756, 2001.
202. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:321-329. 2001.
203. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int*. 57:2285-2298. 2000.
204. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 86:1266-1272. 2000.
205. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol*. 161:430-439. 1998.
206. Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblast. *Kidney Int*. 52:1497-1510. 1997.
207. Ruiz-Ortega M, Gonzalez S, Seron D, Condom E, Bustos C, Largo R, Gonzalez E, Ortiz A, Egido J. ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immune complex nephritis. *Kidney Int*. 48:1778-1791.1995.
208. Rupérez M, Rodríguez-Díez R, Blanco-Colio LM, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Esteban V, Carvajal G, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/Rock and MAPK pathway. *Hypertension*. 50:377-383. 2007.
209. Rupérez M, Sánchez-López E, Blanco-Colio LM, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M: The Rho-kinase pathway regulates angiotensin II-induced renal damage. *Kidney Int.Suppl*. S39-S45. 2005.

-
210. Rupérez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*. 108:1499-1505. 2003.
211. Ryseck RP, Macdonald-Bravo H, Mattei MG, Bravo R. Structure, mapping, and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein. *Cell Growth Differ*. 2:225-233. 1991.
212. Samanta AK, Huang HJ, Bast RC Jr, Liao WS. Overexpression of MEKK3 confers resistance to apoptosis through activation of NFkappaB. *J Biol Chem*. 279(9):7576-83. 2004.
213. Samarasinghe R, Tailor P, Tamura T, Kaisho T, Akira S, Ozato K. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. *J Interferon Cytokine Res*. 26(12):893-900. 2006.
214. Sánchez-López E, Lopez AF, Esteban V, Yague S, Egido J, Ruiz-Ortega M, Alvarez-Arroyo MV. Angiotensin II regulates vascular endothelial growth factor via hypoxia-inducible factor-1alpha induction and redox mechanisms in the kidney. *Antioxid Redox Signal*. 7:1275-1284. 2005.
215. Sato H, Tanaka T, Kasai K, Kita T, Tanaka N. Role of p38 mitogen-activated protein kinase on renal dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *Shock*. 24:488-494. 2005.
216. Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, Poncelet AC. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 284:F243-F252. 2003.
217. Segarini PR, Nesbitt JE, Li D, Hays LG, Yates JR III, Carmichael DF. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *J Biol Chem*. 276:40659-40667. 2001.
218. Shames BD, Selzman CH, Meldrum DR, Pulido EJ, Barton HA, Meng X, Harken AH, McIntyre RC Jr. Interleukin-10 stabilizes inhibitory kappaB-alpha in human monocytes. *Shock*. 10(6):389-94. 1998.
219. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Hypertension*. 26:164-170. 1995.
220. Shi MN, Huang YH, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Relationship between transforming growth factor beta1 and anti-fibrotic effect of interleukin-10. *World J Gastroenterol*. 21;12(15):2357-62. 2006.
221. Shimo T, Nakanishi T, Kimura Y, Nishida T, Ishizeki K, Matsumura T, Takigawa M. Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells. *J Biochem*. 124:130-140. 1998.

-
222. Shi-Wen X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19(2):133-44. 2008.
223. Simi A, Lerouet D, Pinteaux E, Brough D. Mechanisms of regulation for interleukin-1beta in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology.* 52(8):1563-9. 2007.
224. Solt LA, Madge LA, Orange JS, May MJ. Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *J Biol Chem.* 282(12):8724-33.2007.
225. Sommer M, Eismann U, Gerth J, Stein G. Interleukin 4 co-stimulates the PDGF-BB- and bFGF-mediated proliferation of mesangial cells and myofibroblasts. *Nephron.* 92(4):868-80. 2002.
226. Stambe C, Atkins RC, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ. Activation and cellular localization of the p38 and JNK MAPK pathways in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 64:2121-2132. 2003.
227. Stambe C, Nikolic-Paterson DJ, Hill PA, Dowling J, Atkins RC. p38 Mitogen-activated protein kinase activation and cell localization in human glomerulonephritis: correlation with renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 15:326-336. 2004.
228. Stenvinkel P, Andersson P, Wang T, et al: ACE-inhibitors suppress tumor necrosis factor- α production in advanced chronic renal failure?. *J Intern Med.* 246:F766-772. 1999.
229. Stockand JD, Sansom SC. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol Rev.* 78(3):723-44. 1998
230. Suzuki S, Ebihara I, Tomino Y, Koide H. Transcriptional activation of matrix genes by transforming growth factor beta 1in mesangial cells. *Exp Nephrol.* 1(4):229-37. 1993.
231. Suzuki D, Toyoda M, Umezono T, Uehara G, Zhang SY, Sakai T, Nishina M, Suga T, Endoh M, Yagame M, Sakai H. Glomerular expression of connective tissue growth factor mRNA in various renal diseases. *Nephrology (Carlton).* 8(2):92-7. 2003.
232. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:881-900. 2003.
233. Szeto CC, Chow KM, Lai KB, Szeto CY, Kwan BC, Li PK. Connective tissue growth factor is responsible for transforming growth factor-beta-induced peritoneal mesothelial cell apoptosis. *Nephron Exp Nephrol.* 103(4):e166-74. 2006.
234. Tesch GH, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Role of interleukin-1 in mesangial cell proliferation and matrix deposition in experimental mesangioproliferative nephritis. *Am.J.Pathol.* 151:141-150. 1997.
235. Thomson SE, McLennan SV, Kirwan PD, Heffernan SJ, Hennessy A, Yue DK, Twigg SM. Renal connective tissue growth factor correlates with glomerular basement membrane thickness and

- prospective albuminuria in a non-human primate model of diabetes: possible predictive marker for incipient diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*. Apr 15. 2008.
236. Tian W, Zhang Z, Cohen DM. MAPK signaling and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279:F593-F604. 2000.
 237. Tomita N, Morishita R, Tomita S, Gibbons GH, Zhang L, Horiuchi M, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T, Dzau VJ. Transcription factor decoy for NFkappaB inhibits TNF-alpha-induced cytokine and adhesion molecule expression *in vivo*. *Gene Ther* .7:1326-1332. 2000.
 238. Uhm WS, Na K, Song GW, Jung SS, Lee T, Park MH, Yoo DH. Cytokine balance in kidney tissue from lupus nephritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 42(8):935-8. 2003.
 239. Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Masubuchi K, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. C-Jun-NH2-terminal kinase mediates expression of connective tissue growth factor induced by transforming growth factor-beta1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 28(6):754-61. 2003.
 240. Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, Endre ZA, Gobe G, Johnson DW. Interleukin-1beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int*. 62:31-40. 2002.
 241. Wahab NA, Weston BS, Roberts T, Mason RM. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol*. 13:2437-2445. 2002.
 242. Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res*. 307(2):305-14. 2005.
 243. Wahab NA, Schaefer L, Weston BS, Yiannikouris O, Wright A, Babelova A, Schaefer R, Mason RM. Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli. *Diabetologia*. 48(12):2650-60. 2005.
 244. Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Connective tissue growth factor CCN2 interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA. *J Am Soc Nephrol*. 16(2):340-51. 2005.
 245. Wahab N, Cox D, Witherden A, Mason RM. Connective tissue growth factor (CTGF) promotes activated mesangial cell survival via up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1). *Biochem J* 406:131-138. 2007.
 246. Wamsley-Davis A, Padda R, Truong LD *et al.*. AT1A-mediated activation of kidney JNK1 and SMAD2 in obstructive uropathy: preservation of kidney tissue mass using candesartan. *Am J Physiol Renal Physiol*. 287:F474-F480. 2004.

-
247. Wang W, Liu F, Chen N. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) agonists attenuate the profibrotic response induced by TGF-beta1 in renal interstitial fibroblasts. *Mediators Inflamm.* 2007;62641. 2007.
248. Wang Y, Ji HX, Xing SH, Pei DS, Guan QH. SP600125, a selective JNK inhibitor, protects ischemic renal injury via suppressing the extrinsic pathways of apoptosis. *Life Sci.* 80:2067-2075. 2007.
249. Werber HI, Emancipator SN, Tykocinski ML, Sedor JR: The interleukin 1 gene is expressed by rat glomerular mesangial cells and is augmented in immune complex glomerulonephritis. *J.Immunol.* 138:3207-3212. 1987.
250. Wickert L, Chatain N, Kruschinsky K, Gressner AM. Glucocorticoids activate TGF-beta induced PAI-1 and CTGF expression in rat hepatocytes. *Comp Hepatol.* 2;6:5. 2007.
251. Wilmer WA, Tan LC, Dickerson JA, Danne M, Rovin BH. Interleukin-1beta induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation. *J Biol Chem.* 272:10877-10881. 1997.
252. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 25:913-917. 1995.
253. Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol.* 3:1531-1540. 1993.
254. Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest.* 100:1047-1058. 1997.
255. Wolf G, Ritz E. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int.* 67:799-812. 2005.
256. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 70:1914-1919. 2006.
257. Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L, Zhou GP, Chen ZQ. Lipoxin A4 inhibits connective tissue growth factor-induced production of chemokines in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 69(2):248-56. 2006.
258. Wu SH, Lu C, Dong L, Zhou GP. p42/44 MAPK mediates synthesis of fractalkine by mesangial cells stimulated by connective tissue growth factor. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 22(1):37-9. 2006.
259. Yamamoto T, Sawada Y, Katayama I, Nishioka K. Nodular scleroderma: increased expression of connective tissue growth factor. *Dermatology.* 211(3):218-23. 2005.

-
260. Yang C, Patel K, Harding P, Sorokin A, Glass WF 2nd. Regulation of TGF-beta1/MAPK-mediated PAI-1 gene expression by the actin cytoskeleton in human mesangial cells. *Exp Cell Res.* 313(6):1240-50. 2007.
261. Ying Z, King ML. Isolation and characterization of xnov, a xenopus laevis ortholog of the chicken nov gene. *Gene.* 171:243-248. 1996.
262. Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Nishida T, Takigawa M, Sugawara A, Nakao K. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 15: 1430-1440. 2004.
263. Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, Suganami T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 282(5):F933-42. 2002.
264. Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M, Mori K, Makino H, Suganami T, Nagae T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis. *Am J Kidney Dis.* 3:S134-S138. 2001.
265. Yokoo T, Kitamura M. Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1. *Am.J.Physiol.* 270:F123-F130. 1996.
266. Yosimichi G, Kubota S, Nishida T, Kondo S, Yanagita T, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Takigawa M. Roles of PKC, PI3K and JNK in multiple transduction of CCN2/CTGF signals in chondrocytes. *Bone* 38:853-863. 2006.
267. Yosimichi G, Nakanishi T, Nishida T, Hattori T, Takano-Yamamoto T, Takigawa M. CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). *Eur J Biochem.* 268(23):6058-65. 2001.
268. Zhang C, Zhu ZH, Liu JS, Yang X, Deng AG. Role of connective tissue growth factor in human renal tubular epithelial cell transdifferentiation in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 85(41):2920-5. 2005.
269. Zhang A, Ding G, Huang S, Wu Y, Pan X, Guan X, Chen R, Yang T. c-Jun NH2-terminal kinase mediation of angiotensin II-induced proliferation of human mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288:F1118-F1124. 2005.
270. Zhang XL, Topley N, Ito T, Phillips A. Interleukin-6 regulation of transforming growth factor (TGF)-beta receptor compartmentalization and turnover enhances TGF-beta1 signaling. *J Biol Chem.* 280(13):12239-45. 2005.

271. Zeisberg M, Strutz F, Müller GA. Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 10(3):315-20. 2001.
272. Zhou G, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway. *Am J Pathol*. 165(6):2033-43. 2004.
273. Zhuang S, Yan Y, Daubert RA, Han J, Schnellmann RG. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 292:F440-F447. 2007.
274. Zimmerman MA, Reznikov LL, Raeburn CD, Selzman CH. Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury. *J Surg Res*. 121(2):206-13. 2004.

Anexo

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados o enviados a publicar parcialmente en:

Artículos originales:

- **Sánchez-López E**, Rodríguez-Vita J, Cartier C, Rupérez M, Esteban V, Carvajal G, Rodríguez-Díez R, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. Inhibitory effect of interleukin-1beta on angiotensin II-induced connective tissue growth factor and type IV collagen production in cultured mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 294(1):F149-60. 2008.
- Rodríguez-Díez R, Carvajal-González G, **Sánchez-López E**, Rodríguez-Vita J, Díez RR, Selgas R, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by Angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways. Aceptado en *Pharmaceutical Research*. 2008.
- Carvajal G, Rodríguez-Vita J, Rodríguez-Díez R, **Sánchez-López E**, Rupérez M, Cartier C, Esteban V, Ortiz A, Egido J, Mezzano SA, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int*. May 28. 2008.
- **Sánchez-López E**, Rayego S, Sánchez Rodríguez J, Rodríguez-Díez R, Díez RR, Rodríguez-Vita J, Stark L, Ortiz A, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor regulates inflammatory cell infiltration in the kidney through Nuclear factor-kappa B pathway activation. En fase de redacción. Será enviado a *J Am Soc Nephrol*.
- Rupérez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am.J.Pathol*. 163:1937-1947. 2003.
- Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int.Suppl*.12-22, 2002

Revisiones:

- Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, **Sánchez-López E**, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 74:196-206. 2007.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Ruperez M, **Sánchez-López E**, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens*. 15:159-166. 2006.

- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, **Sánchez-López E**, Carvajal G, Egido J. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol.Dial.Transplant.* 21:16-20. 2006.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Ruperez M, **Sánchez-López E**, López AF, Rodríguez-Vita J, Egido J. "Angiotensina II: auténtica citoquina en el daño vascular". *Nefrología.* 24:26. 2004.

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- Rupérez M, Rodríguez-Díez R, Blanco-Colio LM, **Sánchez-López E**, Rodríguez-Vita J, Esteban V, Carvajal G, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways. *Hypertension.* 50(2):377-83. 2007.
- **Sánchez-López E**, López AF, Esteban V, Yague S, Egido J, Ruiz-Ortega M, Alvarez-Arroyo MV. Angiotensin II regulates vascular endothelial growth factor via hypoxia-inducible factor-1alpha induction and redox mechanisms in the kidney. *Antioxid.Redox.Signal.* 7:1275-1284. 2005.
- Rodríguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, **Sánchez-López E**, Plaza JJ, Egido J. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 97:125-134. 2005.
- Rodríguez-Vita J, **Sánchez-López E**, Esteban V, Rupérez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation.* 111:2509-2517. 2005.
- Rupérez M, **Sánchez-López E**, Blanco-Colio LM, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. The Rho-kinase pathway regulates angiotensin II-induced renal damage. *Kidney Int.Suppl.* S39-S45. 2005.
- Esteban V, Ruperez M, **Sánchez-López E**, Rodríguez-Vita J, Lorenzo O, Demaegdt H, Vanderheyden P, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 13;96(9):965-73. 2005.
- Rupérez M, Blanco-Colio LM, **Sánchez-López E**, Esteban V, Rodríguez-Vita. J, Egido. J, Ruiz-Ortega. M. Las estatinas regulan la síntesis del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) inducido por la Angiotensina II. ¿Un efecto adicional vasoprotector? *Investigación cardiovascular.* Vol 7, N:1, 60-80, 2004.

- Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, **Sánchez-López E**, Egido J. Modulation of Angiotensin II effects, a potential novel approach to inflammatory and immune diseases. *Curr Med Chem, Anti-inflammatory Anti-Allergic Agents* 2;379-394. 2003.

Premios:

- Premio de Investigación en Nefrología Hospal 2003 de la Sociedad Española de Nefrología por el trabajo titulado “El factor de crecimiento conectivo tisular es un mediador de la fibrosis causada por la Angiotensina II.” Mónica Rupérez, Vanesa Esteban, Luis Blanco-Colio, Óscar Lorenzo, **Elsa Sánchez-López**, Juan Rodríguez-Vita, Andrés López-Gerena, Marta Ruiz-Ortega.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas:

- **Elsa Sánchez-López**, Juan Rodriguez-Vita, Monica Ruperez, Cecile Cartier, Vanesa Esteban, Gisselle Carvajal, Raquel Rodrigues-Díaz, Jesus Egido, y Marta Ruiz-Ortega. “Interleukin-1 β modulates Angiotensin II-mediated fibrotic and inflammatory responses. Role of MAPK and NF- κ B pathways”. Poster. ASN San Diego 2006
- **Elsa Sánchez-López**, Juan Rodríguez-Vita, Monica Rupérez, Vanesa Esteban, Gisselle Carvajal, Raquel Rodríguez-Díaz, Jesus Egido, Marta Ruiz-Ortega. “La Interleuquina-1 β modula la respuesta fibrótica e inflamatoria causada por Angiotensina II. Papel de las rutas de señalización de las MAPK y del factor de transcripción NF κ B.” Poster . Congreso Iberoamericano de Nefrología. Madrid. 2006.
- López AF, Esteban V, **Sánchez-López E**, Rodríguez-Vita J, Ruperez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. “Connective tissue growth factor (CTGF) activates nuclear factor- κ B (NF- κ B) in tubulo epithelial cells”. Poster. ASN. St Louis. 2004.
- **E. Sanchez-López**, M. Rupérez, J. Rodriguez-Vita, V. Esteban, A.F. Lopez, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. “Interleukin-1 β inhibits connective tissue growth factor and fibronectin production caused by Angiotensin II in mesangial cells”. Poster. ESH. París. 2004.